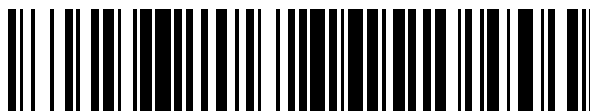


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 900**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2013 PCT/US2013/043516**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13181486**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2013 E 13730702 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2854849**

54 Título: **Formulaciones estabilizadas que contienen anticuerpos anti-DII4**

30 Prioridad:

31.05.2012 US 201261653478 P

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

23.05.2018

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

(100.0%)

777 Old Saw Mill River Road

Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

WALSH, SCOTT y

DIX, DANIEL

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 668 900 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

Formulaciones estabilizadas que contienen anticuerpos anti-Dll4

- 5 Esta solicitud se está presentando el 31 de mayo de 2013, como una solicitud de patente internacional PCT y reivindica prioridad a la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/653.478, presentada el 31 de mayo de 2012.

Campo

- 10 La presente invención se refiere al campo de formulaciones de anticuerpos terapéuticos. Más específicamente, la presente invención se refiere al campo de formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo que se une específicamente al ligando 4 de tipo delta humano (Dll4).

Listado de secuencias

- 15 Un archivo de texto legible por ordenador conforme a ST.25 de un listado de secuencias se presenta simultáneamente con la presente memoria descriptiva de acuerdo con 37 C.F.R. § 1.821(e). Los contenidos del archivo de texto se incorporan en este documento por referencia. Una copia en papel del listado de secuencias, que según 37 C.F.R. § 1.821(f) es idéntica al contenido del archivo de texto legible por ordenador conforme a ST.25, se incluye como parte de la parte de la presente memoria descriptiva y se incorpora en este documento por referencia.

Antecedentes

- 25 La ruta de señalización de Notch es un sistema para la comunicación entre células usado por una amplia gama de eucariotas para muchos procesos biológicos, tales como diferenciación, proliferación y homeostasis. Delta de tipo 4 (Dl4) o el ligando 4 de tipo delta (Dll4) (a partir de ahora "Dll4") es un miembro de la familia Delta de ligandos de Notch que muestra expresión altamente selectiva por el endotelio vascular (Shutter *et al.* (2000) *Genes Develop.* 14:1313-1318). Dll4 es un ligando para receptores Notch, incluyendo Notch1 y Notch4. La secuencia de aminoácidos para Dll4 se representa en la SEQ ID NO: 9. Dada la importante función que la ruta de señalización de Dll4-Notch desempeña en la regulación de la angiogénesis y su implicación en la salud humana y en medicina, se desea desarrollar e implementar medicamentos basados en Dll4. Uno de dichos medicamentos basados en Dll4 es un anticuerpo terapéutico específico para Dll4.
- 30
- 35 Los métodos para producir anticuerpos útiles como agentes terapéuticos humanos incluyen la generación de anticuerpo quiméricos y anticuerpos humanizados (véase, por ejemplo, el documento US 6.949.245). Véase, por ejemplo, el documento WO 94/02602 (Abgenix) y el documento US 6.596.541 (Regeneron Pharmaceuticals), que describen métodos de generación de ratones transgénicos no humanos que pueden producir anticuerpos humanos. Las patentes de Estados Unidos n.º 7.488.806, 7.534.868 y 7.919.593 y la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2011-0150905A1 divulgan anticuerpos contra Dll4 humano.

- Los anticuerpos terapéuticos deben formularse de una manera que no solamente haga que los anticuerpos sean adecuados para la administración a pacientes, sino también de una manera que mantenga su estabilidad durante el almacenamiento y el posterior uso. Por ejemplo, los anticuerpos terapéuticos en solución líquida son propensos a fragmentación, precipitación, agregación y modificaciones químicas indeseadas salvo que la solución se formule apropiadamente. La estabilidad de un anticuerpo en formulación líquida depende no solamente de los tipos de excipientes usados en la formulación, sino también de las cantidad y proporciones de los excipientes unos respecto a otros. Además, deben tenerse en cuenta otras consideraciones aparte de la estabilidad cuando se prepara una formulación líquida de anticuerpos. Los ejemplos de dichas consideraciones adicionales incluyen la viscosidad de la solución y la concentración del anticuerpo que puede acomodarse para una formulación dada, y la calidad visual o atractivo de la formulación. Por tanto, cuando se formula un anticuerpo terapéutico, debe tenerse gran cuidado en llegar a una formulación que permanezca estable, contenga una concentración adecuada de anticuerpo y posea una viscosidad adecuada, así como otras propiedades que posibiliten que la formulación se administre convenientemente a los pacientes.

- 55 Los anticuerpos contra Dll4 son un ejemplo de una macromolécula terapéuticamente relevante que requiere formulación apropiada. Aunque algunas anticuerpos anti-Dll4 son conocidos, no obstante sigue existiendo una necesidad en la técnica de novedosas formulaciones farmacéuticas que comprendan anticuerpos anti-Dll4 que sean suficientemente estables y adecuadas para su administración a pacientes.

Sumario

- 60 La presente invención satisface la necesidad mencionada anteriormente proporcionando formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo humano que se une específicamente al ligando 4 de tipo delta humano (Dll4). El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones. Se proporciona una formulación farmacéutica líquida, que comprende: (i) un anticuerpo que se une específicamente a Dll4; (ii) un

tampón; (iii) un codisolvente orgánico; y (iv) estabilizantes térmicos. Se proporciona un anticuerpo a una concentración de aproximadamente 20 + 3 mg/ml a aproximadamente 75 + 11,25 mg/ml. El anticuerpo se proporciona a una concentración de aproximadamente 25 mg/ml ± 3,75 mg/ml. Se proporciona un anticuerpo a una concentración de aproximadamente 50 mg/ml ± 7,5 mg/ml.

5 En una realización, los anticuerpos anti-DII4 ejemplares de la invención comprenden dominios HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos respectivas de la SEQ ID NO: 2, 3, 4, 6, 7 y 8 (por ejemplo, REGN421). En una realización, el anticuerpo comprende la secuencias CDR contenidas dentro de una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 5.

15 En una realización, el pH de la formulación líquida es de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,6; pH 6,0 ± 0,5, pH 6,0 ± 0,4, pH 6,0 ± 0,3, pH 6,0 ± 0,2, pH 6,0 ± 0,1, pH 6,0 ± 0,05, pH 6,0 ± 0,01 o pH 6,0. En la formulación de la invención, el pH de la formulación líquida es aproximadamente pH 6,0 ± 0,5. En una realización, el tampón tiene un intervalo tamponante eficaz de aproximadamente pH 5,8 a aproximadamente pH 8,0; o de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente 7,5. En una realización, el tampón tiene un pKa de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,5. En una realización, el tampón tiene un pKa de 6,0. En una realización, el tampón tiene un pKa de 6,4. En una realización, el tampón tiene un pKa de 6,5. En una realización, el tampón tiene un pKa de 7,2.

20 En la formulación de la invención, el tampón es un tampón fosfato. En una realización, el fosfato está a una concentración de 5 mM ± 0,75 mM a 50 mM ± 7,5 mM. En una realización, el fosfato está a una concentración de 5 mM ± 0,75 mM o aproximadamente 5 mM. En la formulación de la invención, el fosfato está a una concentración de 10 mM ± 1,5 mM o aproximadamente 10 mM. En una realización, el fosfato está a una concentración de 15 mM ± 2,25 mM o aproximadamente 15 mM. En una realización, el fosfato está a una concentración de 20 mM ± 3 mM o aproximadamente 20 mM. En una realización, el fosfato está a una concentración de 25 mM ± 3,75 mM o aproximadamente 25 mM. En una realización, el fosfato está a una concentración de 30 mM ± 4,5 mM o aproximadamente 30 mM. En una realización, el fosfato está a una concentración de 35 mM ± 5,25 mM o aproximadamente 35 mM. En una realización, el fosfato está a una concentración de 40 mM ± 6 mM o aproximadamente 40 mM. En una realización, el fosfato está a una concentración de 45 mM ± 6,75 mM o aproximadamente 45 mM. En una realización, el fosfato está a una concentración de 50 mM ± 7,5 mM o aproximadamente 50 mM.

35 En una realización, el codisolvente orgánico es un polímero no iónico que contiene un resto de polioxietileno. En algunas realizaciones, el codisolvente orgánico es uno cualquiera o más de polisorbato 20, polisorbato 80, poloxámero 188 y polietilenglicol 3350. En una realización específica, el codisolvente orgánico es polisorbato 20.

40 En una realización, el codisolvente orgánico está a una concentración de aproximadamente un 0,005 % ± 0,00075 % a aproximadamente un 1 % ± 0,15 % "en peso a volumen" o "p/v", donde, *por ejemplo*, 0,1 g/ml = 10 % y 0,01 g/ml = 1 %. En la formulación de la invención, el codisolvente orgánico es polisorbato 20, que está a una concentración de un 0,2 % ± 0,03 % p/v, o aproximadamente 0,2 % p/v. En otra realización, el codisolvente orgánico es polisorbato 20, que está a una concentración de un 0,01 % ± 0,0015 % p/v o aproximadamente 0,01 % p/v.

45 En una realización, el estabilizante es un azúcar, una sal, un aminoácido o una combinación de uno cualquiera o más de los mismos. En una realización, el azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, sorbitol, manitol, glicerol y trehalosa; la sal es cloruro de sodio; y el aminoácido es glicina. En una realización, el estabilizante comprende una combinación de sacarosa y cloruro de sodio.

50 En una realización, la sacarosa está a una concentración de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 40 %, p/v; y el cloruro de sodio es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 250 mM. La formulación de la invención comprende un 10 % ± 1,5 %, aproximadamente un 10 % o un 10 % de sacarosa; y 150 mM ± 22,5 mM, aproximadamente 150 mM o 150 mM de cloruro de sodio. En otra realización, la formulación comprende un 20 % ± 3 %, aproximadamente un 20 % o un 20 % de sacarosa.

55 En una realización, la viscosidad de la formulación es de aproximadamente un 1 cPoise a aproximadamente 5 cPoise. En una realización, la viscosidad de la formulación es 1,5 cPoise ± 0,23 cPoise, aproximadamente 1,5 cPoise o 1,5 cPoise.

60 En una realización, la osmolalidad de la formulación está cercana a un intervalo fisiológico. En una realización, la formulación tiene una osmolalidad de aproximadamente 300 miliosmoles por kilogramo (mOsm) a aproximadamente 700 mOsm. En una realización, la osmolalidad de la formulación es 650 mOsm ± 98 mOsm, aproximadamente 650 mOsm o 650 mOsm.

65 En una realización, al menos un 95 % del anticuerpo anti-DII4 recuperado de la formulación farmacéutica líquida después de 24 meses de almacenamiento a -80 °C está sin agregar y sin degradar, como se determina por cromatografía por exclusión de tamaño. En una realización, al menos un 57 % del anticuerpo anti-DII4 recuperado de la formulación farmacéutica líquida después de 24 meses de almacenamiento a -80 °C es de forma no básica y no

ácida (es decir, pico principal o forma de carga principal o "pico de región 2"), como se determina por cromatografía de intercambio iónico. En una realización, el anti-DII4 mantiene de promedio aproximadamente un 65 % a aproximadamente un 135 % de su actividad de unión después de 24 meses de almacenamiento a -80 °C, respecto a la actividad de unión del anticuerpo antes del almacenamiento.

5 En una realización, al menos un 95 % del anticuerpo anti-DII4 recuperado de la formulación farmacéutica líquida después de 18 meses de almacenamiento a -30 °C está sin agregar y sin degradar, como se determina por cromatografía por exclusión de tamaño. En una realización, al menos un 57 % del anticuerpo anti-DII4 recuperado de la formulación farmacéutica líquida después de 18 meses de almacenamiento a -30 °C es de la forma de carga principal, como se determina por cromatografía de intercambio iónico. En una realización, el anticuerpo anti-DII4
10 mantiene de promedio aproximadamente un 65 % a aproximadamente un 135 % de su actividad de unión después de 18 meses de almacenamiento a -30 °C, respecto a la actividad de unión del anticuerpo antes del almacenamiento.

15 En una realización, al menos un 95 % del anticuerpo anti-DII4 recuperado de la formulación farmacéutica líquida después de seis meses de almacenamiento a -20 °C está sin agregar y sin degradar, como se determina por cromatografía por exclusión de tamaño. En una realización, al menos un 60 % del anticuerpo anti-DII4 recuperado de la formulación farmacéutica líquida después de seis meses de almacenamiento a -20 °C es de la forma de carga principal, como se determina por cromatografía de intercambio iónico. En una realización, el anticuerpo anti-DII4
20 mantiene de promedio aproximadamente un 65 % a aproximadamente un 135 % de su actividad de unión después de seis meses de almacenamiento a -20 °C, respecto a la actividad de unión del anticuerpo antes del almacenamiento.

25 En una realización, al menos un 95 % del anticuerpo anti-DII4 recuperado de la formulación farmacéutica líquida después de seis meses de almacenamiento a 5 °C está sin agregar y sin degradar, como se determina por cromatografía por exclusión de tamaño. En una realización, al menos un 61 % del anticuerpo anti-DII4 recuperado de la formulación farmacéutica líquida después de seis meses de almacenamiento a 5 °C es de la forma de carga principal, como se determina por cromatografía de intercambio iónico. En una realización, el anticuerpo anti-DII4
30 mantiene de promedio aproximadamente un 65 % a aproximadamente un 135 % de su actividad de unión después de seis meses de almacenamiento a 5 °C, respecto a la actividad de unión del anticuerpo antes del almacenamiento.

35 En una realización, al menos un 97 % del anticuerpo anti-DII4 recuperado de la formulación farmacéutica líquida después de seis meses de sobrecarga térmica a 25 °C está sin agregar y sin degradar, como se determina por cromatografía por exclusión de tamaño. En una realización, al menos un 53 % del anticuerpo anti-DII4 recuperado de la formulación farmacéutica líquida después de seis meses de almacenamiento a 25 °C es de la forma de carga principal, como se determina por cromatografía de intercambio iónico. En una realización, el anticuerpo anti-DII4
40 mantiene de promedio aproximadamente un 65 % a aproximadamente un 135 % de su actividad de unión después de seis meses de almacenamiento a 25 °C, respecto a la actividad de unión del anticuerpo antes del almacenamiento.

45 En una realización, al menos un 94 % del anticuerpo anti-DII4 recuperado de la formulación farmacéutica líquida después de 28 días de sobrecarga térmica a 45 °C está sin agregar y sin degradar, como se determina por cromatografía por exclusión de tamaño. En una realización, al menos un 45 % del anticuerpo anti-DII4 recuperado de la formulación farmacéutica líquida después de 28 días de sobrecarga térmica a 45 °C es de la forma de carga principal, como se determina por cromatografía de intercambio iónico. En una realización, el anticuerpo anti-DII4
50 mantiene de promedio aproximadamente un 65 % a aproximadamente un 135 % de su actividad de unión después de 28 días de sobrecarga térmica a 45 °C, respecto a la actividad de unión del anticuerpo antes de la aplicación de la condición de sobrecarga térmica.

55 En una realización, al menos un 96 % del anticuerpo anti-DII4 recuperado de la formulación farmacéutica líquida después de 28 días de sobrecarga térmica a 37 °C está sin agregar y sin degradar, como se determina por cromatografía por exclusión de tamaño. En una realización, al menos un 51 % del anticuerpo anti-DII4 recuperado de la formulación farmacéutica líquida después de 28 días de sobrecarga térmica a 37 °C es de la forma de carga principal, como se determina por cromatografía de intercambio iónico. En una realización, el anticuerpo anti-DII4
60 mantiene de promedio aproximadamente un 65 % a aproximadamente un 135 % de su actividad de unión después de 28 días de sobrecarga térmica a 37 °C, respecto a la actividad de unión del anticuerpo antes de la aplicación de la condición de sobrecarga térmica.

65 En una realización, al menos un 97 % del anticuerpo anti-DII4 recuperado de la formulación farmacéutica líquida después de 28 días de sobrecarga térmica a 25 °C está sin agregar y sin degradar, como se determina por cromatografía por exclusión de tamaño. En una realización, al menos un 57 % del anticuerpo anti-DII4 recuperado de la formulación farmacéutica líquida después de 28 días de sobrecarga térmica a 25 °C es de la forma de carga principal, como se determina por cromatografía de intercambio iónico. En una realización, el anticuerpo anti-DII4
70 mantiene de promedio aproximadamente un 65 % a aproximadamente un 135 % de su actividad de unión después de 28 días de sobrecarga térmica a 25 °C, respecto a la actividad de unión del anticuerpo antes de la aplicación de la condición de sobrecarga térmica.

- En una realización, al menos un 98 % del anticuerpo anti-DII4 recuperado de la formulación farmacéutica líquida después de 120 minutos de sobrecarga por agitación está sin agregar y sin degradar, como se determina por cromatografía por exclusión de tamaño. En una realización, al menos un 59 % del anticuerpo anti-DII4 recuperado de la formulación farmacéutica líquida después de 120 minutos de sobrecarga por agitación es de la forma de carga principal, como se determina por cromatografía de intercambio iónico. En una realización, el anti-DII4 mantiene de promedio aproximadamente un 65 % a aproximadamente un 135 % de su actividad de unión después de 120 minutos de sobrecarga por agitación, respecto a la actividad de unión del anticuerpo antes de la aplicación de la condición de sobrecarga por agitación.
- En una realización, al menos un 98 % del anticuerpo anti-DII4 recuperado de la formulación farmacéutica líquida después de ocho ciclos de congelación/descongelación está sin agregar y sin degradar, como se determina por cromatografía por exclusión de tamaño. En una realización, al menos un 58 % del anticuerpo anti-DII4 recuperado de la formulación farmacéutica líquida después de ocho ciclos de congelación/descongelación es de la forma de carga principal, como se determina por cromatografía de intercambio iónico. En una realización, el anti-DII4 mantiene de promedio aproximadamente un 65 % a aproximadamente un 135 % de su actividad de unión después de ocho ciclos de congelación/descongelación, respecto a la actividad de unión del anticuerpo antes de la aplicación de la condición de sobrecarga por congelación/descongelación.
- En un aspecto, se proporciona una formulación farmacéutica líquida, que comprende: (i) de 20 ± 3 mg/ml a $75 \pm 11,25$ mg/ml de un anticuerpo humano que se une específicamente a DII4 humano; (ii) de $5 \text{ mM} \pm 0,75 \text{ mM}$ a $50 \text{ mM} \pm 7,5 \text{ mM}$ de fosfato; (iii) de $0,005 \% \pm 0,000075 \%$ a un $1 \% \pm 0,15 \%$ (p/v) de polisorbato 20; (iv) de un $5 \% \pm 0,75 \%$ a un $40 \% \pm 6 \%$ (p/v) de sacarosa; y (v) de $50 \text{ mM} \pm 7,5 \text{ mM}$ a $250 \text{ mM} \pm 37,5 \text{ mM}$ de cloruro de sodio, a un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. El anticuerpo anti-DII4 de este aspecto comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) y una región variable de cadena ligera (LCVR) de modo que la combinación HCVR / LCVR comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada y ligera (HCDR1-HCDR2-HCDR3 / LCDR1-LCDR2-LCDR3), que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2- 3 - 4 / SEQ ID NO. 6 - 7 - 8, respectivamente. En una realización particular, el anticuerpo anti-DII4 comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprenden una secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 5, respectivamente (anticuerpo REGN421 de las patentes de Estados Unidos n.º 7.488.806, 7.534.868 y 7.919.593, y publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2011-0150905).
- En una realización de la invención, la formulación líquida comprende (i) $25 \text{ mg/ml} \pm 3,75 \text{ mg/ml}$ de anticuerpo REGN421; (ii) $10 \pm 1,5 \text{ mM}$ de fosfato; (iii) un $0,2 \% \pm 0,03 \%$ (p/v) de polisorbato 20; (iv) un $10 \% \pm 1,5 \%$ (p/v) de sacarosa; y (v) $150 \text{ mM} \pm 22,5 \text{ mM}$ de cloruro de sodio a un pH de $6,0 \pm 0,5$. En una realización, después de sobrecarga térmica de la formulación a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 28 días, $\geq 94 \%$ del anticuerpo retiene su conformación nativa, $\geq 45 \%$ del anticuerpo es de la forma de carga principal y $\geq 98 \%$ del anticuerpo retiene su actividad de unión. En otra realización, después de sobrecarga térmica de la formulación a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 28 días, $\geq 97 \%$ del anticuerpo es nativo y $\geq 59 \%$ del anticuerpo es de la forma de carga principal y aproximadamente un 100 % del anticuerpo retiene su actividad de unión. En una realización, después de sobrecarga térmica de la formulación a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 28 días, $\geq 97 \%$ del anticuerpo es nativo y $\geq 57 \%$ del anticuerpo es de la forma de carga principal y aproximadamente un 100 % del anticuerpo retiene su actividad de unión. En una realización de esta formulación particular, después de ocho ciclos de congelación seguida por descongelación, $\geq 98 \%$ del anticuerpo es nativo y $\geq 59 \%$ del anticuerpo es de la forma de carga principal y aproximadamente un 100 % del anticuerpo retiene su actividad de unión. En una realización de esta formulación particular, después de 120 minutos de sobrecarga por agitación, $\geq 98 \%$ del anticuerpo es nativo y $\geq 58 \%$ del anticuerpo es de la forma de carga principal y al menos aproximadamente un 98 % del anticuerpo retiene su potencia.
- En un aspecto, se proporciona una formulación farmacéutica líquida de cualquiera de los aspectos precedentes en un recipiente. En una realización, el recipiente es un vial de policarbonato. En otra realización, el recipiente es un vial de vidrio, que en algunas realizaciones es un vial de vidrio de borosilicato de tipo 1 con un tapón de gauto de butilo recubierto con fluorocarbono. En otra realización más, el recipiente es una bolsa, tal como una bolsa de gotero intravenoso (IV), que en algunas realizaciones está hecho de poli(cloruro de vinilo) o poliolefina. En otra realización, el recipiente es un dispositivo de inyección, tal como un microinfusor o una jeringa. Se describe una formulación farmacéutica que comprende (a) $25 \text{ mg/ml} \pm 3,75 \text{ mg/ml}$ de un anticuerpo anti-Ang-2, (b) $10 \text{ mM} \pm 1,5 \text{ mM}$ de fosfato, pH $6 \pm 0,5$, (c) un $0,2 \% \pm 0,03 \%$ de polisorbato 20, (d) un $10 \% \text{ p/v} \pm 1,5 \%$ de sacarosa, y se proporciona (e) $150 \text{ mM} \pm 22,5 \text{ mM}$ de cloruro de sodio, donde (a) el anticuerpo comprende un HCVD de la SEQ ID NO: 1 y un LCVD de la SEQ ID NO: 5, (b) el anticuerpo tiene una masa molecular de aproximadamente 146 kDa, aproximadamente 147 kDa o aproximadamente 150 kDa, (c) de aproximadamente un 82 % a aproximadamente un 87 % de los anticuerpos contienen cadenas de oligosacárido fucosilado y (d) las cadenas pesadas del anticuerpo carecen de una lisina C-terminal. La formulación farmacéutica consiste en (a) $25 \text{ mg/ml} \pm 3,75 \text{ mg/ml}$ de un anticuerpo anti-Ang-2, (b) $10 \text{ mM} \pm 1,5 \text{ mM}$ de fosfato, pH $6 \pm 0,5$, (c) un $0,2 \% \pm 0,03 \%$ de polisorbato 20, (d) un $10 \% \pm 1,5 \%$ de sacarosa, y se proporciona (e) $150 \text{ mM} \pm 22,5 \text{ mM}$ de cloruro de sodio, donde (a) el anticuerpo comprende un HCVD de la SEQ ID NO: 1 y un LCVD de la SEQ ID NO: 5, (b) el anticuerpo tiene una masa molecular de aproximadamente 146 kDa, aproximadamente 147 kDa o aproximadamente 150 kDa, (c) de aproximadamente un 82 % a aproximadamente un 87 % de los anticuerpos contienen cadenas de oligosacárido

fucosilado y (d) las cadenas pesadas del anticuerpo carecen de una lisina C-terminal.

En un aspecto, se proporciona un kit que comprende una composición farmacéutica de uno cualquiera de los aspectos precedentes, un recipiente e instrucciones. En una realización, el recipiente es una jeringa precargada. En una realización, el recipiente es un vial de borosilicato equipado con un tapón de caucho 4023/50 recubierto con FLUROTEC.

Otras realizaciones de la presente invención llegarán a ser evidentes a partir de una revisión de la consiguiente descripción detallada.

Descripción

Antes de describir la presente invención, tiene que entenderse que esta invención no está limitada a métodos y condiciones experimentales particulares descritos, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en este documento es con el fin de describir realizaciones particulares únicamente, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Salvo que definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Como se usa en este documento, el término "aproximadamente", cuando se usa en referencia a un valor numérico o intervalo de valores indicado particular, significa que el valor puede variar del valor indicado en no más de un 5 %. Por ejemplo, como se usa en este documento, la expresión "aproximadamente 100" incluye 95 y 105 y todos los valores entremedias (por ejemplo, 95,00, 95,01, 95,02, 95,03, 95,04, ..., 104,96, 104,97, 104,98, 104,99, 105,00).

Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de la presente invención, ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

Como se usa en este documento, la expresión "formulación farmacéutica" significa una combinación de al menos un ingrediente activo (por ejemplo, una molécula pequeña, macromolécula, compuesto, etc. que es capaz de ejercer un efecto biológico en un ser humano o animal no humano) y al menos un ingrediente inactivo que, cuando se combina con el ingrediente activo o uno o más ingredientes inactivos adicionales, es adecuado para la administración terapéutica a un ser humano o animal no humano. El término "formulación", como se usa en este documento, significa "formulación farmacéutica" salvo que se indique específicamente otra cosa. La presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden al menos un polipéptido terapéutico. De acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención, el polipéptido terapéutico es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a la proteína ligando-4 de tipo delta humano (Dll4). Más específicamente, la presente invención incluye formulaciones farmacéuticas que comprenden: (i) un anticuerpo humano que se une específicamente a Dll4 humano; (ii) un tampón fosfato; (iii) un codisolvente orgánico que es un tensoactivo no iónico; y (iv) un estabilizante que es un carbohidrato o una sal inorgánica, o una combinación de carbohidrato y sal inorgánica. Los componentes ejemplares específicos y formulaciones incluidos dentro de la presente invención se describen en detalle a continuación.

ANTICUERPOS QUE SE UNEN ESPECÍFICAMENTE A DLL4

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender un anticuerpo humano, que se une específicamente a Dll4 humano. Como se usa en este documento, el término "Dll4" significa un ligando 4 de tipo delta humano, que es un ligando específico vascular de Notch. Generalmente se entiende que la ruta de señalización de Dll4-Notch modula la angiogénesis bloqueando la ramificación de vasos sanguíneos y promoviendo la maduración de los vasos sanguíneos (Dll4 como regulador negativo de la ramificación; revisado en Sainsin y Harris, Trends in Molecular Medicine, Vol. 13(9):389-395, septiembre de 2007). Los agentes que antagonizan la ruta de Dll4-Notch han demostrado inhibir la tasa de crecimiento tumoral "activando una angiogénesis excesiva pero no funcional." (Véase Sainsin at 389.) Dll4 está regulado por aumento por VEGF y se cree que promueve el desarrollo organizado de vasos nuevos funcionales. Una secuencia de aminoácidos de Dll4 humano ejemplar se describe en la SEQ ID NO: 9. Los anticuerpos contra Dll4 humano se describen en las patentes n.º 7.488.806, 7.534.868 y 7.919.593.

El término "anticuerpo", como se usa en este documento, generalmente pretende hacer referencia a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como multímeros de las mismas (por ejemplo, IgM); sin embargo, las moléculas de inmunoglobulina que consisten en únicamente cadenas pesadas (es decir, carecen de cadenas ligeras) también están incluidas dentro de la definición del término "anticuerpo". Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como HCVR o V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena

ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como LCVR o V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio (CL1). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones flanqueantes (FR). Cada V_H y V_L está compuesta de tres CDR y de cuatro FR, dispuestas del extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Salvo que se indique específicamente de otra manera, se entenderá que, el término "anticuerpo", como se usa en este documento, abarcará moléculas de anticuerpo completas así como fragmentos de unión a antígeno de las mismas. La expresión "parte de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "parte de anticuerpo" o "fragmento de anticuerpo"), como se usa en este documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a Dll4 humano o un epítipo del mismo.

Un "anticuerpo aislado", como se usa en este documento, pretende hacer referencia a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a Dll4 humano está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes a Dll4 humano), con la excepción notable de anticuerpos biespecíficos (o multiespecíficos) que se unen específicamente a Dll4 por un lado, y a otro epítipo por el otro. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular o agentes químicos.

La expresión "se une específicamente" o similares, significa que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica puede caracterizarse por una constante de disociación de al menos aproximadamente 1×10^{-6} M o mayor. Los métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, diálisis en equilibrio, resonancia de plasmón superficial, y similares. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a Dll4 humano puede tener, sin embargo, reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas Dll4 de otras especies (ortólogos). En el contexto de la presente invención, los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos) que se unen a Dll4 humano, así como uno o más antígenos adicionales se considera que "se unen específicamente" a Dll4 humano.

Los anticuerpos anti-Dll4 humano ejemplares que pueden incluirse en las formulaciones farmacéuticas de la presente invención se exponen en las patentes de Estados Unidos n.º 7.488.806, 7.534.868, 7.919.593 y la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2011-0150905.

De acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención, el anticuerpo anti-Dll4 humano es una IgG1 humana que comprende una región variable de cadena pesada del subtipo IGHV3-33.01 y una región variable de cadena ligera del subtipo IGKV3-11.01 (véase Barbie y Lefranc, *The Human Immunoglobulin Kappa Variable (IGKV) Genes and Joining (IGKJ) Segments*, Exp. Clin. Immunogenet. 1998; 15:171-183; y Scaviner, D. *et al.*, *Protein Displays of the Human Immunoglobulin Heavy, Kappa and Lambda Variable and Joining Regions*, Exp. Clin. Immunogenet., 1999; 16:234-240). Las secuencias de la línea germinal IGHV3-33 y IGKV3-11, y los números de asignación de la posición de aminoácidos presentados en este documento concuerdan con el sistema de información internacional Immunogenetics (IMGT), como se describe en Lefranc, M.-P., *et al.*, IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®, Nucl. Acids Res, 37, D1006-D1012 (2009).

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-Dll4 humano comprende una o más sustituciones de aminoácido en una o más regiones flanqueantes respecto a la región variable de cadena pesada canónica, que se espera de forma razonable que provoque una distribución de cargas alterada en toda la superficie expuesta del anticuerpo y, por lo tanto, afecte a su interacción con el disolvente circundante y los excipientes. En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácido comprende una sustitución de serina por alanina, metionina por treonina y/o ácido glutámico por glutamina en posiciones IMGT 54, 86 y 90, respectivamente, de IGHV3-33.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-Dll4 humano comprende una o más sustituciones de aminoácido en una o más CDR respecto a la región variable de cadena ligera canónica, que se espera razonablemente que provoque una distribución de cargas alterada en toda la superficie expuesta del anticuerpo y, por lo tanto, afecte a su interacción con el entorno disolvente. En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácido comprende la sustitución de histidina por glutamina en la posición IMGT 106 de IGKV3-11.

De acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención, el anticuerpo anti-Dll4 humano, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada (HCDR) 1 de la SEQ ID NO: 2, una HCDR2 de la SEQ ID NO: 3 y una HCDR3 de la SEQ ID NO: 4. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-Dll4 humano, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una HCVD de la SEQ ID NO: 1.

De acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención, el anti-Dll4 humano, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región determinante de complementariedad de cadena ligera (kappa) (LCDR) 1

de la SEQ ID NO: 6, una LCDR2 de la SEQ ID NO: 7 y una LCDR3 de la SEQ ID NO: 8. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-DII4 humano, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una LCVD de la SEQ ID NO: 5.

5 El anticuerpo ejemplar no limitante, usado en los ejemplos de este documento se mencionan como REGN421, como en los documentos US 7.488.806, US 7.534.868, US 7.919.593 y US 2011-0150905. Este anticuerpo comprende un par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR que tiene las SEQ ID NO: 1/5, y dominios HCDR1-HCDR2-HCDR3 / LCDR1-LCDR2-LCDR3 representados por la SEQ ID NO: 2 - 3 - 4 / SEQ ID NO: 6 - 7 - 8.

10 La cantidad de anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, contenida dentro de las formulaciones farmacéuticas puede variar dependiendo de las propiedades específicas deseadas de las formulaciones, así como las circunstancias particulares y fines para los que se pretenden las formulaciones a usar. En determinadas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas son formulaciones líquidas que pueden contener de 20 mg/ml \pm 3 mg/ml a 75 mg/ml \pm 11,25 mg/ml de anticuerpo; de 25 \pm 3,75 mg/ml a 70 \pm 10,5 mg/ml de anticuerpo; de 30 \pm 4,5 mg/ml a 65 \pm 9,75 mg/ml de anticuerpo; de 35 \pm 5,25 mg/ml a 60 \pm 9 mg/ml de anticuerpo; de 40 \pm 6 mg/ml a 55 \pm 8,25 mg/ml de anticuerpo; de 45 \pm 6,75 mg/ml a 50 \pm 7,5 mg/ml de anticuerpo; 25 mg/ml \pm 3,75 mg/ml; aproximadamente 25 mg/ml; 25 mg/ml; 50 mg/ml \pm 7,5 mg/ml; aproximadamente 50 mg/ml; o 50 mg/ml de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a DII4 humano.

20 EXCIPIENTES Y PH

Las formulaciones farmacéuticas comprenden uno o más excipientes. El término "excipiente", como se usa en este documento, significa cualquier agente no terapéutico añadido a la formulación para proporcionar una consistencia, viscosidad o efecto estabilizante deseado.

25 En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende al menos un codisolvente orgánico en un tipo y en una cantidad que estabiliza el anticuerpo contra DII4 humano en condiciones de manipulación tosca o agitación, tal como, *por ejemplo*, agitación con vórtice. En algunas realizaciones, lo que se entiende por "estabiliza" es el mantenimiento de al menos un 95 % del anticuerpo contra DII4 en su estado nativo, *es decir*, no fragmentado o agregado, del anticuerpo (en una base molar) sobre el transcurso de la manipulación tosca, tal como por agitación con vórtice de la solución de anticuerpo-codisolvente orgánico durante aproximadamente 60 minutos o aproximadamente 120 minutos.

30 En determinadas realizaciones, el codisolvente orgánico es un tensioactivo no iónico, tal como un poli(óxido de etileno) de alquilo. Los tensioactivos no iónicos específicos que pueden incluirse en las formulaciones de la presente invención incluyen, *por ejemplo*, polisorbatos tales como polisorbato 20, polisorbato 28, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 65, polisorbato 80, polisorbato 81 y polisorbato 85; poloxámeros tales como poloxámero 181, poloxámero 188, poloxámero 407; o polietilenglicol (PEG). El polisorbato 20 también es conocido como TWEEN 20, monolaurato de sorbitán y monolaurato de polioxietilensorbitán. El poloxámero 188 también es conocido como PLURONIC F68.

35 La cantidad de tensioactivo no iónico contenida dentro de las formulaciones farmacéuticas puede variar dependiendo de las propiedades específicas deseadas de las formulaciones, así como las circunstancias particulares y fines para los que están pretendidas las formulaciones. En determinadas realizaciones, las formulaciones pueden contener de un 0,01 % \pm 0,0015 % a un 1 % + 0,15 % de tensioactivo. Por ejemplo, las formulaciones de la presente invención pueden comprender aproximadamente un 0,0085 %; aproximadamente un 0,01 %; aproximadamente un 0,02 %; aproximadamente un 0,03 %; aproximadamente un 0,04 %; aproximadamente un 0,05 %; aproximadamente un 0,06 %; aproximadamente un 0,07 %; aproximadamente un 0,08 %; aproximadamente un 0,09 %; aproximadamente un 0,1 %; aproximadamente un 0,11 %; aproximadamente un 0,12 %; aproximadamente un 0,13 %; aproximadamente un 0,14 %; aproximadamente un 0,15 %; aproximadamente un 0,16 %; aproximadamente un 0,17 %; aproximadamente un 0,18 %; aproximadamente un 0,19 %; aproximadamente un 0,20 %; aproximadamente un 0,21 %; aproximadamente un 0,22 %; aproximadamente un 0,23 %; aproximadamente un 0,24 %; aproximadamente un 0,25 %; aproximadamente un 0,3 %; aproximadamente un 0,4 %; aproximadamente un 0,5 %; aproximadamente un 0,6 %; aproximadamente un 0,7 %; aproximadamente un 0,8 %; aproximadamente un 0,9 %; aproximadamente un 1 %; aproximadamente un 1,1 %; aproximadamente un 1,15 %; o aproximadamente un 1,2 % de polisorbato 20 o poloxámero 188.

40 La formulación farmacéutica también comprende uno o más estabilizantes en un tipo y en una cantidad que estabiliza el anticuerpo contra DII4 humano en condiciones de sobrecarga térmica. En algunas realizaciones, lo que se entiende por "estabiliza" es mantener más de aproximadamente un 94 % del anticuerpo en una conformación nativa cuando la solución que contiene el anticuerpo y el estabilizante térmico se mantiene a aproximadamente 45 °C durante hasta aproximadamente 28 días. En algunas realizaciones, lo que se entiende por "estabiliza" es mantener más de aproximadamente un 96 % del anticuerpo en una conformación nativa cuando la solución que contiene el anticuerpo y el estabilizante térmico se mantiene a aproximadamente 37 °C durante hasta aproximadamente 28 días. Como se usa en este documento, "nativo" significa la forma principal del anticuerpo por exclusión de tamaño, que generalmente es un monómero intacto del anticuerpo.

En determinadas realizaciones, el estabilizante térmico es un azúcar o alcohol de azúcar seleccionado de sacarosa, sorbitol, glicerol, trehalosa y manitol, o cualquier combinación de los mismos, cuya cantidad contenida dentro de la formulación puede variar dependiendo de la circunstancias específicas y los fines pretendidos para los que se usa la formulación. En determinadas realizaciones, las formulaciones pueden contener de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 40 % de azúcar o alcohol de azúcar; de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 20 % de azúcar o alcohol de azúcar; de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 15 % de azúcar o alcohol de azúcar; de aproximadamente un 7,5 % a aproximadamente un 12,5 % de azúcar o alcohol de azúcar; aproximadamente un 10 % de azúcar o alcohol de azúcar; un 10 % \pm 1,5 % de azúcar o alcohol de azúcar; o un 10 % de azúcar o alcohol de azúcar. Por ejemplo, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender un 4 % \pm 0,6 %; un 5 % \pm 0,75 %; un 6 % \pm 0,9 %; un 7 % \pm 1,05 %; un 8 % \pm 1,2 %; un 9 % \pm 1,35 %; un 10 % \pm 1,5 %; un 11 % \pm 1,65 %; un 12 % \pm 1,8 %; un 13 % \pm 1,95 %; o aproximadamente un 14 % \pm 2,1 % de azúcar o alcohol de azúcar; (por ejemplo, sacarosa, trehalosa o manitol).

Las formulaciones farmacéuticas también pueden comprender un tampón o sistema tamponante, que sirve para mantener un pH estable y para ayudar a estabilizar el anticuerpo contra Dll4 humano. En algunas realizaciones, lo que se entiende por "estabiliza" es cuando al menos un 94 % del anticuerpo está en su conformación nativa como se determina por cromatografía por exclusión de tamaño cuando la solución que contiene el anticuerpo y el tampón se mantiene a aproximadamente 45 °C durante hasta aproximadamente 28 días. Por "nativa" o "conformación nativa", lo que se entiende es la fracción de anticuerpo que no se agrega o degrada. Esto se determina generalmente por un ensayo que mide el tamaño relativo de la entidad de anticuerpo, tal como un ensayo cromatográfico por exclusión de tamaño. El anticuerpo no agregado y no fragmentado eluye en una fracción que equivale al anticuerpo nativo y generalmente es la fracción de elución principal. El anticuerpo agregado eluye en una fracción que indica un tamaño mayor que el anticuerpo nativo. El anticuerpo fragmentado eluye en una fracción que indica un tamaño menor que el anticuerpo nativo.

En algunas realizaciones, lo que se entiende por "estabiliza" es cuando al menos un 45 % del anticuerpo está en su forma de carga principal como se determina por cromatografía de intercambio catiónico cuando la solución que contiene el anticuerpo y el tampón se mantiene a aproximadamente 45 °C durante hasta aproximadamente 28 días. Por "carga principal" o "forma de carga principal", lo que se entiende es la fracción de anticuerpo que eluye de una resina de intercambio iónico en el pico principal, que generalmente está flanqueado por picos más "básicos" en un lado y picos más "ácidos" en el otro lado.

Las formulaciones farmacéuticas pueden tener un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. Por ejemplo, las formulaciones de la presente invención pueden tener un pH de aproximadamente 5,5; aproximadamente 5,6; aproximadamente 5,7; aproximadamente 5,8; aproximadamente 5,9; aproximadamente 6,0; aproximadamente 6,1; aproximadamente 6,2; aproximadamente 6,3; aproximadamente 6,4; o aproximadamente 6,5. En algunas realizaciones, el pH es 6,0 \pm 0,5; 6,0 \pm 0,4; 6,0 \pm 0,3; 6,0 \pm 0,2; 6,0 \pm 0,1; aproximadamente 6,0; o 6,0.

En algunas realizaciones, el tampón o sistema tamponante comprende al menos un tampón que tiene un intervalo tamponante que solapa completamente o en parte el intervalo de pH 5,5 - 7,4, tal como, *por ejemplo*, un tampón que tiene un intervalo tamponante útil de pH 4,8 a pH 8,8. En una realización, el tampón tiene un pKa de aproximadamente 7,21. En determinadas realizaciones, el tampón comprende un tampón fosfato. En determinadas realizaciones, el fosfato está presente a una concentración de 5 mM \pm 0,75 mM a 15 mM \pm 2,25 mM; de 6 mM \pm 0,9 mM a 14 mM \pm 2,1 mM; de 7 mM \pm 1,05 mM a 13 mM \pm 1,95 mM; de 8 mM \pm 1,2 mM a 12 mM \pm 1,8 mM; de 9 mM \pm 1,35 mM a 11 mM \pm 1,65 mM; 10 mM \pm 1,5 mM; o aproximadamente 10 mM. En determinadas realizaciones, el sistema tamponante comprende fosfato a 10 mM \pm 1,5 mM, a un pH de 6,0 \pm 0,5.

FORMULACIONES EJEMPLARES

De acuerdo con un aspecto, la formulación farmacéutica líquida tiene baja viscosidad (es decir, menos de 10 cPoise, o aproximadamente 1,5 cPoise) y tiene una osmolalidad entre 600 y 700 mOsm, o de aproximadamente 650 mOsm; y comprende: (i) 25 mg/ml \pm 3,75 mg/ml, o 50 mg/ml \pm 7,5 mg/ml de un anticuerpo humano que se une específicamente a Dll4 humano (por ejemplo, REGN421); (ii) un sistema tamponante que tampona a aproximadamente pH 6,0 \pm 0,5; (iii) un estabilizante térmico que comprende un azúcar y una sal, que sirve como un; y (iv) un codisolvente orgánico.

De acuerdo con una realización, la formulación farmacéutica comprende: (i) de 20 \pm 3 mg/ml a 60 \pm 9 mg/ml de anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente a Dll4 humano y que comprende una región variable de cadena pesada de tipo IGHV3-33 sustituida y una región variable de cadena ligera de tipo IGKV3-11 sustituida; (ii) un tampón fosfato, que tampona a pH 6,0 \pm 0,5; (iii) sacarosa y cloruro de sodio; y (iv) un detergente no iónico, tal como un polisorbato.

De acuerdo con una realización, la formulación farmacéutica comprende: (i) 25 mg/ml \pm 3,75 mg/ml de anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente a Dll4 humano y que comprende una HCDR1 de la SEQ ID NO: 2, una HCDR2 de la SEQ ID NO: 3, una HCDR3 de la SEQ ID NO: 4, una LCDR1 de la SEQ ID NO: 6, una LCDR2 de la SEQ ID NO: 7 y una LCDR3 de la SEQ ID NO: 8; (ii) 10 mM \pm 1,5 mM de fosfato, pH 6,0 \pm 0,5; (iii) un 10 % \pm 1,5 %

de sacarosa; (iv) 150 mM \pm 22,5 mM de cloruro de sodio; y (v) un 0,2 % \pm 0,03 % de polisorbato 20.

De acuerdo con una realización, la formulación farmacéutica comprende: (i) 50 mg/ml \pm 7,5 mg/ml de anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente a DII4 humano y que comprende una HCDR1 de la SEQ ID NO: 2, una HCDR2 de la SEQ ID NO: 3, una HCDR3 de la SEQ ID NO: 4, una LCDR1 de la SEQ ID NO: 6, una LCDR2 de la SEQ ID NO: 7 y una LCDR3 de la SEQ ID NO: 8; (ii) 10 mM \pm 1,5 mM de fosfato, pH 6,0 \pm 0,5; (iii) un 10 % \pm 1,5 % de sacarosa; (iv) 150 mM \pm 22,5 mM de cloruro de sodio; y (v) un 0,2 % \pm 0,03 % de polisorbato 20.

De acuerdo con una realización, la formulación farmacéutica comprende: (i) 25 mg/ml \pm 3,75 mg/ml de anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente a DII4 humano y que comprende un dominio variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1, y un dominio variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 5, a una concentración de; (ii) 10 mM \pm 1,5 mM de fosfato, pH 6,0 \pm 0, 5; (iii) un 10 % \pm 1,5 % de sacarosa; (iv) 150 mM \pm 22,5 mM de cloruro de sodio; y (iv) un 0,2 % \pm 0,03 % de polisorbato 20.

De acuerdo con una realización, la formulación farmacéutica comprende: (i) 50 mg/ml \pm 7,5 mg/ml de anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente a DII4 humano y que comprende un dominio variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1, y un dominio variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 5; (ii) 10 mM \pm 1,5 mM de fosfato, pH 6,0 \pm 0,5; (iii) un 10 % \pm 1,5 % de sacarosa; (iv) 150 mM \pm 22,5 mM de cloruro de sodio; y (v) un 0,2 % \pm 0,03 % de polisorbato 20.

Los ejemplos no limitantes adicionales de formulaciones farmacéuticas abarcadas por la presente invención se exponen en otra parte en este documento, incluyendo los ejemplos de trabajo presentados a continuación.

ESTABILIDAD Y VISCOSIDAD DE LAS FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención típicamente muestran altos niveles de estabilidad. El término "estable", como se usa en este documento en referencia a las formulaciones farmacéuticas, significa que los anticuerpos dentro de las formulaciones farmacéuticas retienen un grado aceptable de estructura química o función biológica después de almacenamiento en condiciones definidas. Una formulación puede ser estable aunque el anticuerpo contenido en la misma no mantenga un 100 % de su estructura química o función biológica después de almacenamiento durante una cantidad definida de tiempo. En determinadas circunstancias, el mantenimiento de al menos aproximadamente un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de una estructura o función del anticuerpo después de almacenamiento durante una cantidad definida de tiempo puede considerarse como "estable".

La estabilidad puede medirse, *entre otras cosas*, determinando el porcentaje de anticuerpo nativo que permanece en la formulación después de almacenamiento durante una cantidad definida de tiempo a una temperatura definida. El porcentaje de anticuerpo nativo puede determinarse por, *entre otras cosas*, cromatografía por exclusión de tamaño (por ejemplo, cromatografía de líquidos de alto rendimiento por exclusión de tamaño [SE-HPLC]), de modo que nativo significa no agregado y no fragmentado. Un "grado aceptable de estabilidad", como se usa esa expresión en este documento, significa que al menos un 90 % de la forma nativa del anticuerpo puede detectarse en la formulación después de almacenamiento durante una cantidad definida de tiempo a una temperatura dada. En determinadas realizaciones, al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de la forma nativa del anticuerpo puede detectarse en la formulación después de almacenamiento durante una cantidad definida de tiempo a una temperatura definida. La cantidad definida de tiempo después de la que se mide la estabilidad puede ser de al menos 14 días, al menos 28 días, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses o más. La temperatura definida a la que la formulación farmacéutica puede almacenarse cuando se valúa la estabilidad puede ser cualquier temperatura de aproximadamente -80 °C a aproximadamente 45 °C, *por ejemplo*, almacenamiento a aproximadamente -80 °C, a aproximadamente -30 °C, a aproximadamente -20 °C, a aproximadamente 0 °C, a aproximadamente 4-8 °C, a aproximadamente 5 °C. La sobrecarga térmica puede aplicarse a la formulación farmacéutica para evaluar la estabilidad. La sobrecarga térmica incluye, por ejemplo, mantener la formulación durante aproximadamente 14 días o aproximadamente 28 días a aproximadamente 25 °C, a aproximadamente 35 °C, a aproximadamente 37 °C o a aproximadamente 45 °C.

Por ejemplo, una formulación farmacéutica puede considerarse estable si después de seis meses de almacenamiento a 5 °C, al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98,5 %, 99 % o un 99,5 % del anticuerpo detectado por SE-HPLC es nativo (es decir, en la fracción del pico nativo). La formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de seis meses de almacenamiento a 25 °C al menos un 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 % o un 99,5 % del anticuerpo detectado por SE-HPLC es nativo. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 28 días de almacenamiento a 37 °C, al menos un 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 % o un 99,5 % del anticuerpo detectado por SE-HPLC es nativo. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 28 días de almacenamiento a 45 °C al menos un 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % del anticuerpo detectado por SE-HPLC es nativo. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de seis meses de almacenamiento a -20 °C al menos un 98,5 %, 99 % o un 99,5 % del anticuerpo detectado por SE-HPLC es nativo. Una formulación

farmacéutica también puede considerarse estable si después de 18 meses de almacenamiento a -30 °C al menos un 99 % o un 99,5 % del anticuerpo detectado por SE-HPLC es nativo. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de seis meses de almacenamiento a -80 °C al menos un 99 % o un 99,5 % del anticuerpo detectado por SE-HPLC es nativo.

5 La estabilidad puede medirse, *entre otras cosas*, determinando el porcentaje de anticuerpo que migra en la fracción principal de anticuerpo ("forma de carga principal") durante intercambio iónico, respecto al área de pico combinada total, donde la estabilidad es proporcional a la fracción de anticuerpo en la forma de carga principal. Aunque sin el deseo de limitarse a teoría alguna, la desamidación del anticuerpo puede causar que el anticuerpo quede cargado más negativamente y, por tanto, sea más ácido respecto al anticuerpo no desamidado (véase, porejemplo, Robinson, N., Protein Deamidation, PNAS, 16 de abril de 2002, 99(8):5283-5288). Un "grado aceptable de estabilidad", según se usa la expresión en este documento, significa que al menos un 53 % del anticuerpo está en la forma de carga principal detectada en la formulación después de almacenamiento durante una cantidad definida de tiempo a una temperatura definida. En determinadas realizaciones, un grado aceptable de estabilidad significa que al menos aproximadamente un 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % del anticuerpo puede detectarse en una forma de carga principal después de almacenamiento durante una cantidad definida de tiempo a una temperatura dada, o en sobrecarga térmica, por congelación/descongelación o por agitación. La cantidad definida de tiempo después de la que se mide la estabilidad puede ser al menos 2 semanas, al menos 28 días, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses o más. La temperatura a la que puede almacenarse la formulación farmacéutica cuando se evalúa la estabilidad puede ser cualquier temperatura de aproximadamente -80 °C a aproximadamente 45 °C, por ejemplo almacenamiento a aproximadamente -80 °C, aproximadamente -30 °C, aproximadamente -20 °C, aproximadamente 0 °C, aproximadamente 4-8 °C, aproximadamente 5 °C, aproximadamente 25 °C, aproximadamente 37 °C o aproximadamente 45 °C. Por ejemplo, una formulación farmacéutica puede considerarse estable si después de tres meses de almacenamiento a -80 °C, -30 °C, o -20 °C no menos de aproximadamente un 57 %, 58 %, 59 %, 60 % o 61 % del anticuerpo está en una forma de carga principal. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de seis meses de almacenamiento a 5 °C, no menos de aproximadamente un 59 %, 59,1 %, 59,2 %, 59,3 %, 59,4 %, 59,5 %, 59,6 %, 59,7 %, 59,8 %, 59,9 %, 60 %, 60,1 %, 60,2 %, 60,3 %, 60,4 %, 60,5 %, 60,6 %, 60,7 %, 60,8 %, 60,9 %, 61 % o 61,1 % del anticuerpo está en una forma de carga principal. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de seis meses de almacenamiento a 25 °C, no menos de aproximadamente un 53 % del anticuerpo está en una forma de carga principal. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 28 días de almacenamiento a 37 °C, no menos de aproximadamente un 50 %, 50,5 %, 51 % o 51,5 % del anticuerpo está en una forma de carga principal. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 28 días de almacenamiento a 45 °C, no menos de aproximadamente un 45 %, 45,1 %, 45,2 %, 45,3 %, 45,4 %, 45,5 %, 45,6 %, 45,7 %, 45,8 %, 45,9 % o 50 % del anticuerpo puede detectarse en una forma de carga principal.

40 Medir la afinidad de unión del anticuerpo por su diana también puede usarse para evaluar la estabilidad. Por ejemplo, una formulación de la presente invención puede considerarse estable si, después de almacenamiento a, por ejemplo, -80 °C, -30 °C, -20 °C, 5 °C, 25 °C, 37 °C, 45 °C, etc. durante una cantidad definida de tiempo (por ejemplo, 14 días a 24 meses), el anticuerpo anti-Dll4 contenido dentro de la formulación mantiene al menos un 50 % y hasta aproximadamente un 150 % de la potencia, medida como afinidad de unión, del anticuerpo antes de dicho almacenamiento. La afinidad de unión puede determinarse, por ejemplo, ELISA o resonancia de plasmones. La actividad biológica puede determinarse por un ensayo de actividad de Dll4, tal como, por ejemplo, poniendo en contacto una célula que expresa Dll4 con la formulación que comprende el anticuerpo anti-Dll4. La unión del anticuerpo a dicha célula puede medirse directamente, tal como mediante análisis FACS. Como alternativa, la actividad posterior de la ruta de señalización de Dll4/Notch puede medirse en presencia del anticuerpo y compararse con la actividad ruta de señalización de Dll4/Notch en ausencia de anticuerpo. En algunas realizaciones, el Dll4 puede ser endógeno a la célula. En otras realizaciones, el Dll4 puede expresarse de forma ectópica (heteróloga) en la célula.

55 Métodos adicionales para evaluar la estabilidad de un anticuerpo en formulación se demuestran en los ejemplos presentados a continuación.

RECIPIENTES Y MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

60 Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar contenidas dentro de cualquier recipiente adecuado para almacenamiento o administración de medicinas y otras composiciones terapéuticas. Por ejemplo, las formulaciones farmacéuticas pueden estar contenidas dentro de un recipiente de plástico o de vidrio precintado y esterilizado que tenga un volumen definido tal como un vial, ampolla, jeringa, cartucho, frasco o bolsa IV. Pueden usarse diferentes tipos de viales para contener las formulaciones de la presente invención incluyendo, *por ejemplo*, viales de vidrio o plástico transparentes y opacos (por ejemplo, ámbar). Asimismo, puede usarse cualquier tipo de jeringa para contener o administrar las formulaciones farmacéuticas de la presente invención.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar contenidas dentro de jeringas "de tungsteno normales" o jeringas de "bajo contenido de tungsteno". Como apreciarán los expertos en la materia, el proceso de fabricación de jeringas de vidrio generalmente implica el uso de una varilla de tungsteno caliente que funciona perforando el vidrio creando de ese modo un orificio desde el que puede extraerse líquidos y expulsarse desde la jeringa. Este proceso provoca que se depositen cantidades mínimas de tungsteno sobre la superficie interior de la jeringa. El lavado posterior y otras etapas de procesamiento pueden usarse para reducir la cantidad de tungsteno en la jeringa. Como se usa en este documento, la expresión "tungsteno normal" significa que la jeringa contiene más de o igual a 500 partes por mil millones (ppmm) de tungsteno. La expresión "bajo contenido de tungsteno" significa que la jeringa contiene menos de 500 ppmm de tungsteno. Por ejemplo, una jeringa de bajo contenido de tungsteno, de acuerdo con la presente invención, puede contener menos de aproximadamente 490, 480, 470, 460, 450, 440, 430, 420, 410, 390, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 o menos ppmm de tungsteno.

Los émbolos de caucho usados en las jeringas, y los tapones de caucho usados para cerrar las aberturas de los viales, pueden recubrirse para prevenir la contaminación de los contenidos medicinales de la jeringa o el vial, o para conservar su estabilidad. Por tanto, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, de acuerdo con determinadas realizaciones, pueden estar contenidas dentro de una jeringa que comprende un émbolo recubierto o dentro de un vial que está precintado con un tapón de caucho recubierto. Por ejemplo, el émbolo o tapón puede recubrirse con una película de fluorocarbono. Los ejemplos de tapones o émbolos recubiertos adecuados para su uso con viales y jeringas que contienen las formulaciones farmacéuticas de la presente invención se mencionan en, *por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos n.º 4.997.423; 5.908.686; 6.286.699; 6.645.635; y 7.226.554. Los tapones y émbolos de caucho recubiertos ejemplares particulares que pueden usarse en el contexto de la presente invención están disponibles en el mercado con la marca registrada "FluroTec®", disponible en West Pharmaceutical Services, Inc. (Lionville, PA). FluroTec® es un ejemplo de un recubrimiento de fluorocarbono usado para minimizar o evitar que el producto farmacéutico se adhiera a las superficies de caucho.

De acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención, las formulaciones farmacéuticas pueden estar contenidas dentro de una jeringa de bajo contenido de tungsteno que comprende un émbolo recubierto con fluorocarbono.

Las formulaciones farmacéuticas pueden administrarse a un paciente por vías parenterales tales como inyección (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, etc.) o administración percutánea, a la mucosa, nasal, pulmonar u oral. Pueden usarse numerosos dispositivos de suministro de bolígrafo o autoinyector reutilizable para suministrar de forma subcutánea las formulaciones farmacéuticas de la presente invención. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, RU), DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Suiza), bolígrafo HUMALOG MIX 75/25™, bolígrafo HUMALOG™, bolígrafo HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly y Co., Indianápolis, IN), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhague, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhague, Dinamarca), bolígrafo BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ y OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Alemania). Los ejemplos de dispositivos de suministro por bolígrafo o autoinyector desechable que tienen aplicaciones en suministro subcutáneo de una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, aunque sin limitación, el bolígrafo SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), el FLEXPEN™ (Novo Nordisk) y el KWIKPEN™ (Eli Lilly), el autoinyector SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), el PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemania), el EPIPEN (Dey, L.P.) y el bolígrafo HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL).

El uso de un microinfusor para suministrar las formulaciones farmacéuticas de la presente invención también se contempla en este documento. Como se usa en este documento, el término "microinfusor" significa un dispositivo de suministro subcutáneo diseñado para administrar lentamente volúmenes grandes (por ejemplo, hasta aproximadamente 2,5 ml o más) de una formulación terapéutica durante un periodo prolongado de tiempo (por ejemplo, aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30 o más minutos). Véase, *por ejemplo*, el documento US 6.629.949; el documento US 6.659.982; y Meehan *et al.*, J. Controlled Release 46:107-116 (1996). Los microinfusores son particularmente útiles para el suministro de grandes dosis de proteínas terapéuticas contenidas dentro de soluciones de alta concentración (por ejemplo, aproximadamente 100, 125, 150, 175, 200 o más mg/ml) o viscosas.

En una realización, la formulación farmacéutica se administra mediante un gotero IV, de modo que la formulación se diluya en una bolsa IV que contiene una solución fisiológicamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica es una preparación estéril compuesta en una bolsa de infusión intravenosa, de modo que se diluye una única dosis de producto farmacéutico en 100 ml, 250 ml (u otra cantidad similar adecuada para suministro por gotero intravenoso) de un tampón fisiológico (por ejemplo, solución salina al 0,9 %). En algunas realizaciones, la bolsa de infusión está hecha de un poli(cloruro de vinilo) (por ejemplo, VIAFLEX, Baxter, Deerfield, Illinois). En algunas realizaciones, la bolsa de infusión está hecho de una poliolefina (EXCEL IV Bags, Braun Medical Inc., Bethlehem, Pensilvania).

USOS TERAPÉUTICOS DE LAS FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención son útiles, *entre otras cosas*, para el tratamiento, prevención o mejora de cualquier enfermedad o trastorno asociado con la actividad Dll4, incluyendo enfermedades o

trastornos mediados por Dll4 o la ruta de señalización de Notch. Las enfermedades y trastornos no limitantes ejemplares que pueden tratarse o prevenirse por la administración de las formulaciones farmacéuticas de la presente invención incluyen diversas enfermedades que implican la angiogénesis, que es el proceso biológico por el que se forman nuevos vasos sanguíneos. La angiogénesis aberrante está asociada con varias afecciones patológicas incluyendo, *por ejemplo*, retinopatías proliferativas, artritis reumatoide y psoriasis. Además, está bien establecido que la angiogénesis es crítica para el crecimiento y mantenimiento de los tumores.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación completa y descripción de la manera en que preparar y usar los métodos y composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los autores de la presente invención consideran su invención. Se han hecho esfuerzos por asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algunos errores experimentales y desviaciones. Salvo que se indique de otra manera, las partes son partes por mol, el peso molecular es peso molecular promedio, la concentración porcentual (%) significa la masa del soluto en gramos dividida por el volumen de la solución en mililitros por 100 % (por ejemplo, sacarosa al 10 % significa 0,1 gramo de sacarosa por mililitro de solución), la temperatura es en grados Celsius y la presión es en o cerca la presión atmosférica.

Las actividades de desarrollo de la formulación inicial implicaron cribar codisolventes orgánicos, estabilizantes térmicos y tampones en formulaciones líquidas y liofilizadas de anticuerpos anti-Dll4 para identificar excipientes que sean compatibles con la proteína y potencien su estabilidad, manteniendo al mismo tiempo una osmolalidad casi fisiológica y una baja viscosidad para inyección intravenosa y subcutánea. También se examinaron condiciones tamponantes para determinar el pH óptimo para la estabilidad máxima de la proteína.

Ejemplo 1: Formulación anti-Dll4 ejemplar

Las actividades de desarrollo de la formulación incluyen el cribado de tampones, codisolventes orgánicos y estabilizantes térmicos en formulaciones líquidas del anticuerpo anti-Dll4 para identificar excipientes que potencien la estabilidad de la proteína. También se examinaron condiciones tamponantes para determinar el pH óptimo para la estabilidad máxima de la proteína. Los resultados generados a partir de estos estudios se usaron para desarrollar una formulación líquida estable, adecuada para uso clínico. El anti-Dll4 (por ejemplo, REGN421) se formuló a $25 \pm 3,75$ mg/ml o $50 \pm 7,5$ mg/ml. En una realización, el anticuerpo anti-Dll4 se formula en $10 \pm 1,5$ mM de fosfato (pH $6,0 \pm 0,5$), un $0,2\% \pm 0,03\%$ de polisorbato 20, un $10\% \pm 1,5\%$ de sacarosa y $150 \text{ mM} \pm 22,5 \text{ mM}$ de cloruro de sodio. El tampón fosfato, que es una combinación de fosfato monobásico y fosfato dibásico, se seleccionó por su capacidad tamponante al pH óptimo para la estabilidad del anti-Dll4 y una baja tasa de agregación. Se observó que el anticuerpo anti-Dll4 REGN421 tiene estabilidad óptima y la mínima tasa de agregación y formación de variantes de carga a pH 6,0. El polisorbato 20 se seleccionó como agente estabilizante de agitación, que reducía la tasa de agregación y precipitación cuando el anticuerpo se agitaba y se manipulaba de otra manera. La sacarosa, que se observó que reduce la tasa de agregación del anticuerpo en solución, se seleccionó como componente del agente estabilizante térmico. El cloruro de sodio, que se observó que reduce la formación de especies cargadas del anticuerpo en solución, se seleccionó como otro componente del agente estabilizante térmico.

Ejemplo 2: Metodología del estudio de estabilidad en sobrecarga

Se usó densidad óptica (405 nm) y cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC) en estudios de desarrollo para evaluar la estabilidad física del anticuerpo anti-Dll4 formulado. La estabilidad física se define como la recuperación de formas solubles del anticuerpo en solución. La pérdida de anticuerpo podría deberse a precipitación o adsorción. La presencia de particulados puede detectarse por inspección visual o por mediciones de densidad óptica (DO) a 405 nm (mediciones de turbidez), donde un aumento en DO indica un aumento en la turbidez debido a la formación de particulados. La presencia de particulados determinada visualmente o por mediciones de DO indica que la muestra no ha logrado mantener la estabilidad. La recuperación del anticuerpo anti-Dll4 se midió por RP-HPLC y por espectrometría UV a 280 nm. La concentración de cada muestra de ensayo se determina a partir del área del pico de anticuerpo eluido en comparación con una curva patrón generada usando anticuerpo de concentración definida.

Se usó HPLC por exclusión de tamaño (SE-HPLC) para evaluar la pureza del anticuerpo anti-Dll4 y para proporcionar una medida de cantidades relativas de agregados de anticuerpo, fragmentos e impurezas que difieren en el tamaño molecular del presente anticuerpo anti-Dll4. El anticuerpo anti-Dll4 purificado generalmente eluía como un pequeño pico agregado y un gran pico de dímero nativo seguido por un pequeño pico de bajo peso molecular. Este método empleó una columna por exclusión de tamaño basada en sílice de alta resolución y un tampón fosfato-cloruro de sodio. Se registró la absorbancia a 215 nm y se integró para la determinación de la pureza. La especificación de la pureza para el anticuerpo anti-Dll4 por SE-HPLC requería que el área del pico principal fuera $\geq 90,0\%$ del área de pico total. Los porcentajes del área de pico total para las áreas de picos de alto y bajo peso molecular se presentan en las tablas.

Se analizaron variantes de carga del anticuerpo por cromatografía de intercambio catiónico usando una columna de intercambio catiónico débil de Dionex (PROPAC® WCX-10, 4 x 250 mm) sobre un gradiente salino superficial en tampón fosfato a pH 6,0 (40 mM a 120 mM NaCl durante 44 minutos a 1 ml/min). Se registró la absorbancia a 215 nm y se integró para evaluar la heterogeneidad de carga. Los cromatogramas del anticuerpo anti-DII4 se integraron dividiendo los picos en tres grupos de carga principal: ácido, principal y básico. El grupo de picos que eluía en primer lugar se ha denominado la especie ácida (esto se determinó analizando el material expuesto a alto pH y temperatura). El pico principal en el cromatograma se ha denominado pico principal, forma de carga principal o variante de carga principal. El grupo final de picos se presentó como la especie básica. La denominación se hizo basándose en que la retención prolongada en la columna se debía muy probablemente al alto nivel de carga positiva. El patrón de picos de la muestra de ensayo de anticuerpo se comparó con el patrón de picos del patrón de referencia y las áreas de pico porcentuales de las especies ácida, principal y básica se presentaron.

La actividad o potencia del anticuerpo anti-DII4 se evaluó usando un ensayo de unión. La capacidad de ese anticuerpo de bloquear la unión de hDII4-hFc biotinilado a Notch1 se midió usando un ELISA específico y sensible. El ELISA midió el hDII4-hFc biotinilado no unido en una solución compuesta de una mezcla de biotina-hDII4-hFc y anticuerpo anti-DII4. Las mezclas se añadieron a placas de microvaloración recubiertas con Notch1 humano. Se valoró una cantidad fija de biotina-hDII4-hFc con diversas cantidades de anticuerpo; y se eliminó por lavado el complejo de anticuerpo: biotina-hDII4-hFc. La cantidad de biotina-hDII4-hFc que permanecía unida a la placa se detectó usando estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano rusticano (HRP). Las muestras analizadas se compararon con un patrón de referencia para determinar la potencia relativa. Se usaron sustratos colorimétricos de HRP para la detección y se midió la DO 450 nm. Los valores de DO 450 nm se representaron frente a las concentraciones de anticuerpo en las soluciones y se determinó una CI₅₀ usando análisis de regresión no lineal. La CI₅₀ se definió como la concentración de anticuerpo necesaria para bloquear un 50 % de la unión máxima de biotina-hDII4-hFc a placas recubiertas con hNotch1-hFc, y estos valores reflejan la potencia de bloque del anticuerpo contra DII4. La potencia se determinó por comparación con una muestra patrón de referencia procesada en la misma placa y expresada como un porcentaje del valor de CI₅₀ del patrón de referencia.

Ejemplo 3: Tampón y pH

Se consideró el efecto del pH y el tampón sobre la estabilidad del anti-DII4. El anticuerpo REGN421 ("REGN421") fue el más estable cuando se formulaba con un tampón fosfato 10 mM o un tampón histidina 10 mM. Se eligió fosfato como el tampón para la formulación debido a cuestiones sobre el riesgo potencial de oxidación de la histidina durante el almacenamiento en un estado líquido. La mezcla de fosfato monobásico y fosfato dibásico produce un pH de 6,0 cuando todos los excipientes se añaden juntos con el anticuerpo REGN421.

El análisis de REGN421 tamponado incubado a elevadas temperaturas reveló que las rutas principales de degradación de proteínas eran la formación de agregados, productos de escisión y variantes de carga. Por lo tanto, para evaluar el efecto del pH y el tampón sobre la estabilidad de REGN421, se incubaron muestras de ensayo de REGN421 a 45 °C en diversos tampones a valores de pH que varían de 5,0 a 8,0 para identificar condiciones que aumenten la estabilidad térmica de la proteína (tabla 1). REGN421 obtuvo una estabilidad máxima, determinada tanto por SE-HPLC como por análisis de cromatografía de líquidos de alto rendimiento por intercambio catiónico (CEX-HPLC), cuando la proteína se formulaba a pH 6,0. La formulación de REGN421 en tampón fosfato o histidina a pH 6,0 produjo una mayor estabilidad de la proteína en comparación con la formulación a pH 6,0 en tampón succinato o citrato. Se eligió el fosfato para la formulación de REGN421 a causa de cuestiones sobre el riesgo potencial de oxidación de la histidina durante el almacenamiento a largo plazo en un estado líquido.

Para los resultados mostrados en la tabla 1, se ensayaron 0,3 ml de 25 mg/ml de REGN421 en tampón de ensayo 10 mM que contenía polisorbato 20 al 0,2 % en un vial de vidrio de borosilicato de tipo 1 de 2 ml con un tapón de caucho de butilo 4432/50 recubierto con FluroTec® durante 28 días a 45. La turbidez se presentó como el cambio en la DO₄₀₅ relativa en comparación con el material de partida. Los resultados del material de partida representan los resultados promedio del material de partida para las 14 formulaciones. DO = Densidad óptica; RP-HPLC = Cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase inversa; SE-HPLC = Cromatografía de líquidos de alto rendimiento por exclusión de tamaño; CEX-HPLC = Cromatografía de líquidos de alto rendimiento por intercambio catiónico.

Tabla 1: Efecto del tampón y el pH sobre la estabilidad de REGN421 incubado a 45 °C durante 28 días

Tampón y pH	Aspecto visual	Turbidez (DO 405 nm)	% de REGN421 total recuperado (RP.HPLC)	% de REGN421 nativo recuperado (SE-HPLC)	% de REGN421 nativo recuperado (CEX-HPLC)
Material de partida* (sin incubación a 45 °C)	Superado	0,00	100	97,6	58,5
pH 8,0, Tris	Fallido	0,30	107	85,6	21,0

pH 8,0, Fosfato	Fallido	0,27	100	65,7	5,6
pH 7,5, Fosfato	Fallido	0,12	104	80,1	14,6
pH 7,0, Fosfato	Fallido	0,03	104	83,4	24,9
pH 6,5, Fosfato	Superado	0,00	100	93,1	35,3
pH 6,0, Fosfato	Superado	0,00	104	93,9	38,3
pH 6,0, Histidina	Superado	0,00	103	94,4	41,6
pH 6,0, Succinato	Superado	0,01	102	92,3	40,7
pH 6,0, Citrato	Superado	0,01	99	92,4	36,7
pH 5,5, Citrato	Fallido	0,01	105	91,1	34,6
pH 5,0, Citrato	Fallido	0,02	103	86,7	26,9
pH 5,0, Acetato	Superado	0,01	107	92,3	34,6

Ejemplo 4: Selección de protectores contra sobrecarga por agitación

- 5 Se eligió polisorbato 20 al 0,2 % como codisolvente orgánico porque estabilizaba REGN421 cuando se agitaba en estado líquido. Los estudios que se realizaron inicialmente para controlar la estabilidad de REGN421 después de la agitación en ausencia de codisolventes orgánicos produjeron resultados variables. El análisis de REGN421 agitado mediante SE-HPLC demostró un aumento en la agregación del anticuerpo en un estudio particular, pero no se observó aumento significativo en la agregación en la mayoría de otros estudios de agitación realizado sobre REGN421. Se muestran los resultados de dos estudios de estabilidad representativos en la tabla 2. La estrategia conservativa de añadir polisorbato 20 a la formulación de REGN421 se emprendió, no obstante, para evitar la inestabilidad de la proteína dependiente de agitación potencial que puede producirse durante la fabricación, transporte y manipulación de REGN421. Se eligió polisorbato 20 sobre otros codisolventes orgánicos porque no cambiaba la estabilidad térmica de REGN421.
- 10
- 15 Para los resultados de estabilidad del anticuerpo mostrados en la tabla 2, se combinaron 0,3 ml de 25 mg/ml de REGN421, en fosfato 10 mM, pH 6,0 en un vial de vidrio de borosilicato de tipo 1 de 2 ml con un tapón de caucho de butilo 4432/50 recubierto con FluroTec® con los codisolventes orgánicos y se sometieron a 120 minutos de agitación con vórtice. La turbidez se presentó como el cambio en la DO₄₀₅ relativa en comparación con el material de partida. Los resultados del material de partida representan los resultados promedio del material de partida para las nueve formulaciones. DO = Densidad óptica; RP-HPLC = Cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase inversa; SE-HPLC = Cromatografía de líquidos de alto rendimiento por exclusión de tamaño.
- 20

Tabla 2: Efecto de codisolventes orgánicos sobre la estabilidad del anticuerpo - agitación

Codisolvente orgánico	Sobrecarga	Aspecto visual	% de REGN421 total recuperado (RP.HPLC)	% de REGN421 nativo recuperado (SE-HPLC)	% de agregado de REGN421 recuperado (SE-HPLC)
Material de partida*	Ninguno	Superado	100	96,6	1,5
Sin codisolvente	Agitación con vórtice 120 min	Superado	101	94,9	3,0
Material de partida*	Ninguno	Superado	100	97,8	0,7
Sin codisolvente	Agitación con vórtice 120 min	Superado	101	97,4	0,9
Polisorbato 20 al 0,2 %	Agitación con vórtice 120 min	Superado	99	98,0	0,7
Polisorbato 80 al 0,2 %	Agitación con vórtice 120 min	Superado	100	97,9	0,8
PEG 3350 al 0,2 %	Agitación con vórtice 120 min	Superado	101	98,0	0,7

Ejemplo 5: Selección de protectores contra sobrecarga térmica

Los estabilizantes tales como azúcares, aminoácidos y sales inorgánicas se examinaron para su capacidad de aumentar la estabilidad térmica de REGN421. Se presenta un sumario de los estabilizantes térmicos que se examinaron en la tabla 3. Las formulaciones que contienen sacarosa y trehalosa mostraron la mínima cantidad de formación de agregado de REGN421 determinada por análisis de SE-HPLC. La adición de cloruro de sodio a la formulación demostró disminuir la formación de variantes de carga (CEX-HPLC), pero provocó una cantidad aumentada de formación de agregado (SE-HPLC). Un estudio posterior se realizó para examinar la estabilidad térmica de REGN421 después de la formulación con una combinación de sacarosa al 10 % y cloruro de sodio (NaCl) 150 mM. El objetivo de este estudio fue reducir la agregación inducida por NaCl incluyendo sacarosa en la formulación, manteniendo de esa manera los efectos protectores de NaCl sobre la formación de variantes de carga dentro de la formulación. La concentración de sacarosa se moduló de un 20 % (sin NaCl) a un 10 % (con NaCl) para controlar la osmolalidad de la formulación. La estabilidad térmica de REGN421 en esta formulación determinada por análisis de CEX-HPLC (formación de variantes de carga) fue similar a los resultados usando NaCl como único agente estabilizante (tabla 3), lo que demuestra el efecto protector de NaCl sobre la formación de variantes de carga. Además, la tasa de formación de agregados se disminuyó significativamente en comparación con la formulación usando NaCl como único agente estabilizante, lo que demuestra los efectos estabilizantes de la sacarosa sobre la formulación. Basándose en estos resultados, REGN421 se formuló con sacarosa al 10 % y NaCl 150 mM.

Para los resultados de estabilidad del anticuerpo mostrados en la tabla 3, 0,3 ml de fosfato 10 mM, pH 6,0, polisorbato 20 al 0,2 % y 25 mg/ml de REGN421, más el estabilizante térmico indicado, en un vial de vidrio de borosilicato de tipo 1 de 2 ml con un tapón de caucho de butilo 4432/50 recubierto con FluroTec® se sometieron a 45 °C durante 28 días. La turbidez se presentó como el cambio en la DO₄₀₅ relativa en comparación con el material de partida. Los resultados del material de partida representan los resultados promedio del material de partida para las diez formulaciones no incubadas a 45 °C. DO = Densidad óptica; RP = Cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase inversa; SE = Cromatografía de líquidos de alto rendimiento por exclusión de tamaño; CEX = Cromatografía de líquidos de alto rendimiento por intercambio catiónico.

Tabla 3: Efecto de estabilizantes térmicos sobre la estabilidad

Estabilizante térmico	Aspecto visual	Turbidez (DO 405 nm)	% de REGN421 total recuperado (RP.HPLC)	% de REGN421 nativo recuperado (SE-HPLC)	% de agregado de REGN421 recuperado (SE-HPLC)	% de REGN421 nativo recuperado (CEX-HPLC)
Material de partida* (sin incubación a 45 °C)	Superado	0,00	100	97,7	1,0	58,4
Sin estabilizante térmico	Fallido	0,00	100	94,0	2,0	41,0
NaCl 150 mM	Superado	0,01	100	91,4	4,4	44,7
NaCl 150 mM + sacarosa al 10 %	Superado	0,00	100	94,0	2,1	45,4
Sacarosa al 20 %	Superado	0,00	98	94,5	1,2	40,8
Sorbitol al 20 %	Superado	0,04	99	92,9	2,6	26,9
Manitol al 10 %	Superado	0,00	99	93,8	2,0	39,5
Trehalosa al 20 %	Superado	0,00	99	94,7	1,2	40,2
Glicerol al 5 %	Superado	0,02	100	85,4	10,9	NP
Arginina al 3 %	Fallido	0,02	100	90,1	5,7	42,7
Glicina al 3 %	Superado	0,01	106	91,1	5,0	31,9

Ejemplo 6: Estudios de estabilidad en sobrecarga para formulación de REGN421

Se realizaron estudios de sobrecarga acelerados manteniendo REGN421 a 25 °C durante 6 meses. En esta condición acelerada, se observó un desplazamiento en el perfil de variantes de carga hacia especies más ácidas por cromatografía de intercambio catiónico (CEX-HPLC). Se observó una disminución de un 2 % a un 5 % en la pureza por SDS-PAGE después de seis meses de almacenamiento, junto con una reducción de un 1,6 % en la pureza y un aumento de un 1,2 % en la formación de agregados de alto peso molecular detectada por SE-HPLC. No hubo pérdida de la potencia de REGN421 determinada por el ensayo de unión después de seis meses de almacenamiento a 25 °C.

Los estudios de estabilidad acelerados y de sobrecarga adicionales realizados sobre el anticuerpo REGN421 indican que la proteína es físicamente estable cuando se agita con vórtice durante 60 minutos o 120 minutos, se congela y se descongela de -80 °C a temperatura ambiente durante ocho ciclos, se incuba a 45 °C durante 28 días, se incuba a 37 °C durante 28 días, o se incuba a 25 °C durante 28 días, (tabla 4). Durante estos estudios, la solución permaneció visiblemente transparente, no se observó pérdida de proteína y no se produjo cambio en el pH después de estas sobrecargas. Sin embargo, se detectó una disminución en la pureza de REGN421 por HPLC por exclusión de tamaño; y HPLC por intercambio catiónico cuando la proteína se incubaba a ≥ 25 °C durante 28 días, lo que indica que se producen cambios en el peso molecular y variantes de carga cuando REGN421 se expone a condiciones de sobrecarga. Se detectó un nivel menor de degradación química cuando la proteína se incubaba a 37 °C en comparación con incubación a 45 °C. REGN421 era física y químicamente estable durante el periodo de evaluación de 14 días a 25 °C y después de agitación y ciclos de congelación/descongelación. No se observó pérdida significativa de potencia, determinada usando el ensayo de unión de DII4/Notch, para ninguna de las muestras sobrecargadas.

Tabla 4: Estabilidad en sobrecarga de 25 mg/ml de anticuerpo anti-DII4

Ensayo de sobrecarga	Sin sobrecarga	Agitación		Incubación a 45 °C		Incubación a 37 °C		Incubación a 25 °C		Congelación/descongelación
Duración de la sobrecarga	0 min	60 min	120 min	14 días	28 días	14 días	28 días	14 días	28 días	8 ciclos
Aspecto visual	Superado	Superado	Superado	Superado	Superado	Superado	Superado	Superado	Superado	Superado
Ensayo de sobrecarga	Sin sobrecarga	Agitación		Incubación a 45 °C		Incubación a 37 °C		Incubación a 25 °C		Congelación/descongelación
Turbidez (DO 405 nm)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
pH	5,9	5,9	5,9	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
% de REGN421 total recuperado (RP.HPLC)	100	99	96	96	100	98	100	97	101	99
% de REGN421 nativo recuperado (SE-HPLC)	98,0	97,9	98,0	95,8	94,0	96,9	96,0	97,9	97,7	98,0
% de REGN421 nativo recuperado (CEX-HPLC)	58,4	58,7	59,4	52,2	45,4	55,5	51,5	59,3	57,7	58,8
Ensayo de unión (% de potencia relativa)	89	NP	94	NP	88	NP	101	NP	94	88

Para los resultados de estabilidad del anticuerpo mostrados en la tabla 4, se combinaron 0,3 ml de histidina 10 mM, pH 6,0, polisorbato 20 al 0,2 %, sacarosa al 10 %, NaCl 150 mM y 25 mg/ml de HIH685P, en un vial de vidrio de borosilicato de tipo 1 de 2 ml con un tapón de caucho de butilo 4432/50 recubierto con FluroTec® con los codisolventes orgánicos y se sometieron a las diversas cargas indicadas. La turbidez se presentó como el cambio relativo en la DO a 405 nm en comparación con el material de partida. Los criterios de aceptación para el ensayo de unión fueron un 50-150 % del patrón de referencia. DO = Densidad óptica; RP = Cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase inversa; SE = Cromatografía de líquidos de alto rendimiento por exclusión de tamaño; CEX = Cromatografía de líquidos de alto rendimiento por intercambio catiónico.

Ejemplo 7: Estabilidad en almacenamiento del anticuerpo anti-DII4 formulado

No se observó pérdida significativa e REGN421 por espectrometría UV, o determinada por SDS-PAGE, después de 24 meses de almacenamiento a -80 °C, -30 °C o -20 °C. Se detectó una disminución de un 0,8 % en la pureza y un aumento de un 0,4 % en la formación de agregados por SE-HPLC después de almacenamiento a 5 °C durante 24 meses. No hubo cambio significativo en las variantes de carga detectadas por CEX-HPLC después de 24 meses de almacenamiento a las condiciones ensayadas. No hubo cambios en la potencia determinada por ensayo de unión al final del periodo de almacenamiento. REGN421 siguió cumpliendo los criterios de aceptación para todos los análisis

después de 24 meses de almacenamiento a 5 °C. Véase la tabla 5.

Tabla 5: Estabilidad de 25 mg/ml de REGN421 (fosfato 10 mM, pH 6,0, polisorbato 20 al 0,2 %, sacarosa al 10 % y NaCl 150 mM)

Temperatura/duración de almacenamiento	- 80 °C/24 meses	-30 °C/24 meses	-20 °C/12 meses	5 °C/24 meses
Aspecto	Superado	Superado	Superado	Superado
pH	6,1	6,1	5,9	5,9
Turbidez (DO 405 nm) ¹	0,00	0,00	0,00	0,00
% de REGN421 total recuperado (RP.HPLC)	105	105	99	105
Pureza por HPLC por exclusión de tamaño	99,4	98,8	98,3	97,7
% de pureza del pico principal				
% de especies de APM	0,4	0,5	NA	NA
Análisis de variantes de carga por CE-HPLC	18	18	NA	NA
% de región 1 (ácida)	57	57	59	58,3
% de región 2 (principal)	25	25	NA	NA
% de región 3 (básica)				
Ensayo de unión (% de patrón de referencia)	100	99	95,3	NP

5

Ejemplo 8: Compatibilidad con dispositivo de suministro IV

La formulación de 25 mg/ml de REGN421 se diluyó en una bolsa intravenosa (IV) compuesta de poli(cloruro de vinilo) (PVC) con Di-(2-etilhexil)-ftalato (DEHP) que contiene solución salina normal. Se examinaron tres dosis diferentes de REGN421 en este estudio incluyendo una dosis baja (0,1 mg/kg y 40 kg de paciente), una dosis intermedia (4 mg/kg y 40 kg de paciente) y una dosis alta (16 mg/kg y 120 kg de paciente). Para la dosis baja, se añadió "placebo" adicional a la bolsa para ayudar a estabilizar el REGN421 frente a la agitación.

10

Las bolsas IV que contienen REGN421 diluido se mantuvieron en primer lugar durante 24 horas a 5 °C y después se mantuvieron durante 24 horas adicionales a 25 °C. Después de completarse estas incubaciones, las bolsas IV se conectaron a equipos de infusión, cebados con el anticuerpo diluido y se mantuvieron durante una hora a temperatura ambiente. El anticuerpo diluido se bombeó a través de los equipos de infusión a tasas que varían de 25 ml/h a 500 ml/h. Se utilizaron tres bombas de infusión y tres equipos de infusión que representan los proveedores principales (Alaris, Baxter, y Hospira) en esta investigación. Estos equipos de infusión representan todos los materiales básicos (PVC con DEHP, PVC con TriOctyl-TriMellitate (TOTM), y poliolefinas) que comprenden equipos de infusión con filtros en línea. Todos los equipos de infusión contenían un filtro de polietersulfona de 0,2 µm.

15

20

REGN421 era físicamente estable cuando se mantenía durante 24 horas a 5 °C, se mantenía durante 24 horas a 25 °C (véase tabla 6), se mantenía durante 1 hora a temperatura ambiente en los diversos equipos de infusión y se bombeaba a través de los equipos de infusión que utilizan las diversas bombas de infusión a una tasa de 25 ml/h o 500 ml/h. No se detectaron precipitados por inspección visual o turbidez, el pH de la solución fue estable y no hubo disminución en la concentración de proteína determinada por RP-HPLC detectada en cualquier muestra ensayada. La proteína también era químicamente estable. No se observaron aumentos en las especies de peso molecular o las variantes de carga determinadas por SE-HPLC y CEX-HPLC, respectivamente, en este estudio de compatibilidad.

25

30

Tabla 6

Bolsas IV de solución salina (ml)	REGN421 (mg)	Equipo de infusión IV	REGN421 total recuperado (mg/ml)	% nativo (SE-HPLC)	% de forma de carga principal (CEX-HPLC)
100	8	PVC Alaris con DEHP	0,059	97,6	60,3
100	8	PVC Baxter con TOTM	0,060	97,3	61,8
100	8	PVC revestido con polietileno Hospira	0,061	97,4	61,3
100	160	PVC recubierto con polietileno de baja absorción Alaris	1,40	98,1	59,8
100	160	PVC Baxter con DEHP	1,51	97,5	60,3
100	160	PVC Hospira con TOTM	1,41	97,7	59,9
250	1920	Polipropileno Alaris	6,87	97,7	60,6
250	1920	PVC Baxter con TOTM	6,85	97,9	60,4
250	1920	PVC Hospira con DEHP	6,77	98,0	60,2

Estos datos apoyan las siguientes conclusiones: (a) REGN421 era estable después de dilución de 4 mg de REGN421 en una bolsa IV de 50 ml que contiene solución salina o dilución de 1920 mg de REGN421 en una bolsa IV de 250 ml de solución salina. La bolsa IV de solución salina que contenía solución salina estaba compuesta de PVC que contenía DEHP. (b) El REGN421 diluido era estable después de incubación en una bolsa IV durante periodos de hasta 24 horas a 5 °C o 24 horas a 25 °C. (c) El REGN421 diluido puede administrarse usando una bomba de infusión. (d) El REGN421 diluido puede administrarse con un equipo de infusión compuesto de PVC que contiene DEHP, PVC que contiene TOTM o poliolefina. (e) El uso de un filtro de polietersulfona de 0,2 µm en línea es compatible con REGN421. (f) El REGN421 diluido puede administrarse a una tasa que varía de 25 ml/h a 500 m/h.

Ejemplo 9: Determinación de la masa molecular

El REGN421 formulado se caracterizó con respecto a la estructura y actividad de la proteína. El peso molecular predicho de la proteína de REGN421 nativo sin glucosilación es de aproximadamente 146 kDa. Se realizó SDS-PAGE no reductor para confirmar el peso molecular de la molécula heterotetramérica y para examinar los niveles de las formas de alto y bajo peso molecular de la proteína que se copurificaban con el anticuerpo intacto. Se añadió un reactivo alquilante durante la preparación de la muestra para evitar el arrastre de disulfuro y para minimizar la degradación del anticuerpo debido al calentamiento. El peso molecular observado del anticuerpo glucosilado determinado después de electroforesis y tinción con Coomassie se observó en aproximadamente 150 kDa. La masa de REGN421 también se examinó usando SDS-PAGE en condiciones reductoras. Las muestras se redujeron y calentaron antes de la electroforesis y las bandas de proteína se detectaron por tinción con azul de Coomassie. REGN421 se detectó como dos bandas principales correspondientes a la cadena pesada del anticuerpo (aproximadamente 50 kDa) y la cadena ligera (aproximadamente 25 kDa).

También se empleó electroforesis en capilar-SDS (CE-SDS) para evaluar la masa de REGN421. CE-SDS puede resolver las cadenas polipeptídicas de IgG reducida por tamaño y permite la cuantificación de la heterogeneidad y las variantes que pueden existir en el anticuerpo REGN421. El porcentaje de cadena pesada no glucosilada se calcula a partir de la relación del área de pico corregida de cadena pesada no glucosilada a la suma de las áreas de pico corregidas correspondientes a cadenas pesadas no glucosiladas y glucosiladas. Se observaron dos picos principales en los electroferogramas reductores de CE-SDS para el anticuerpo REGN421. Los dos picos principales para los lotes de sustancia de fármaco se alinean con dos picos principales identificados como la cadena ligera reducida (LC) y la cadena pesada glucosilada (HC) en el patrón de control de IgG. Los pesos moleculares de los picos marcados HC y LC para REGN421 y el patrón de control de IgG son de aproximadamente 60 kDa y 25 kDa, respectivamente. Los pesos moleculares de las cadenas pesada y ligera determinados por este método son ligeramente mayores que los esperados para IgG1 humana, lo que sugiere que esta técnica puede sobreestimar ligeramente los pesos moleculares de las cadenas pesada y ligera. La abundancia relativa de la forma de cadena pesada no glucosilada (NGHC) de los lotes ensayados de REGN421 representan aproximadamente un 1,5 % del área de pico total detectada.

Ejemplo 10: Análisis fucosilación

Se trataron lotes de la sustancia de fármaco de REGN421 con PNGasa F para liberar los oligosacáridos N ligados de la cadena pesada de anticuerpo. Posteriormente se derivatizaron los oligosacáridos libres en el extremo reductor con el reactivo fluorescente, ácido antranílico. Los oligosacáridos modificados se analizaron por HPLC en fase inversa y espectrometría de masas por MALDI-TOF. El examen del cromatograma de HPLC reveló que los oligosacáridos modificados se separaban en dos grupos principales, especies biantenares no fucosiladas y especies biantenares fucosiladas. Dentro de cada grupo (fucosilado frente a no fucosilado), los oligosacáridos se separaban además en formas de digalactosilo (G2), monogalactosilo (G1) o agalactosilo (G0). Las asignaciones de la estructura del oligosacárido se consiguieron a través del análisis de masas de cada oligosacárido fraccionado usando espectrometría de masas por MALDI-TOF. Los lotes de REGN421 que se analizaron contenían entre un 82,4 y un 87,0 % (84,6% ± 1,47 %; promedio ± DT) de cadenas de oligosacárido fucosilado (tabla 7), basándose en la integración de los picos correspondientes en los cromatogramas. El análisis de masas de los oligosacáridos combinados demostró que los oligosacáridos biantenares fucosilados eran la especie dominante, lo que está de acuerdo con el análisis de HPLC. La diferencia observada en la cantidad de galactosilación dentro de las cadena de azúcar N ligadas entre los diversos lotes ensayados de REGN421 refleja la heterogeneidad que puede producirse durante la producción del anticuerpo.

Tabla 7: Patrones de glucosilación de REGN421

	Forma del glucano	Lotes de REGN421					Fórmulas del glucano
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	
No fucosilado	G0 (%)	6,9	7,1	7,9	5,2	3,8	(GlcNAc) ₂ (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
	G1 (%)	3,3	3,9	4,3	3,9	3,7	(GlcNAc) ₂ (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ (Gal) ₁
	G2	0,9	0,8	1,0	1,8	2,1	(GlcNAc) ₂ (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ (Gal) ₂

	Forma del glucano	Lotes de REGN421					Fórmulas del glucano
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	
	(%)						
	Man-5 (%)	4,5	3,5	4,0	4,6	3,6	(GlcNAc) ₂ (Man) ₅
Fucosilado	G0F (%)	36,8	37,2	35,9	29,4	25,2	Fuc(GlcNAc) ₂ (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
	G1F (%)	37,1	37,3	36,0	40,7	45,0	Fuc(GlcNAc) ₂ (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ (Gal) ₁
	G2F (%)	10,4	10,3	10,9	14,3	16,7	Fuc(GlcNAc) ₂ (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ (Gal) ₂
	% de fucosilación	84,3	84,8	82,8	84,4	86,9	

Ejemplo 11: Análisis de lisina C-terminal de la cadena pesada

5 Se usó cartografía de péptidos para confirmar la secuencia C-terminal de REGN421. REGN421 se desnaturalizó en urea 6,0 M, Tris 100 mM, pH 7,5, se redujo con DTT 5 mM y se alquiló con yodoacetamida 12,5 mM. La proteína después se diluyó 6 veces para llegar a una concentración de urea de hasta 1,0 M, y posteriormente se digirió con tripsina (relación 1:20 de enzima a sustrato) a 37 °C durante tres horas. Los péptidos se separaron por HPLC y se analizaron por espectroscopia de masas. Como patrones para la identificación del péptido C-terminal nativo de REGN421, se generaron tres péptidos sintéticos correspondientes a las tres secuencias peptídicas C-terminales putativas más probables (SLSLSP, SLSLSPG y SLSLSPGK; respectivamente la SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12) y se analizaron por HPLC usando un gradiente de elución con disolvente idéntico en comparación con el gradiente usado para eluir los péptidos digeridos con tripsina de REGN421 para facilitar la identificación del péptido C-terminal real en el mapa tríptico de REGN421. El péptido C-terminal derivado de tripsina esperado de SLSLSPGK (SEQ ID NO: 12) no se encontró en los mapas trípticos de ninguno de los lotes de REGN421 ensayados, lo que indica que se eliminaba la Lys C-terminal. En el mapa tríptico, hay únicamente un péptido (elución a 46,60 min) que coelúa con uno de los péptidos sintéticos, (SLSLSPG; SEQ ID NO: 11). Este péptido corresponde al péptido C-terminal de la cadena pesada de REGN421 a través de análisis de masas (masa esperada 659,69, masa observada 660,2). Los resultados sugieren que el procesamiento postraduccional da lugar a eliminación completa de la Lys esperada del extremo C de la cadena pesada.

Listado de secuencias

- 25 <110> WALSH, Scott
DIX, Daniel
- <120> Formulaciones estabilizadas que contienen anticuerpos anti-DII4
- <130> 7400P
- 30 <160> 12
- <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- 35 <210> 1
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>
<223> Sintético
- <400> 1

ES 2 668 900 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Phe Leu Trp Tyr Asp Gly Thr Asn Lys Asn Tyr Val Glu Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Met Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp His Asp Phe Arg Ser Gly Tyr Glu Gly Trp Phe Asp Pro
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético
 <400> 2

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

15 <210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético
 <400> 3

Leu Trp Tyr Asp Gly Thr Asn Lys
 1 5

30 <210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sintético
 <400> 4

Ala Arg Asp His Asp Phe Arg Ser Gly Tyr Glu Gly Trp Phe Asp Pro
 1 5 10 15

40 <210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintético

ES 2 668 900 T3

<400> 5

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 6

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 1 5

15 <210> 7
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

25 <400> 7

Asp Ala Ser
 1

30 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 8

Gln His Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr
 1 5

40 <210> 9
 <211> 685
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

ES 2 668 900 T3

Met Ala Ala Ala Ser Arg Ser Ala Ser Gly Trp Ala Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Val Ala Leu Trp Gln Gln Arg Ala Ala Gly Ser Gly Val Phe Gln Leu
 20 25 30
 Gln Leu Gln Glu Phe Ile Asn Glu Arg Gly Val Leu Ala Ser Gly Arg
 35 40 45
 Pro Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe Arg Val Cys Leu Lys His
 50 55 60
 Phe Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Pro Cys Thr Phe Gly Thr Val Ser
 65 70 75 80
 Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Ala Val Arg Asp Asp Ser Ser
 85 90 95
 Gly Gly Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro Phe Asn Phe Thr Trp Pro
 100 105 110
 Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Trp His Ala Pro Gly Asp Asp
 115 120 125
 Leu Arg Pro Glu Ala Leu Pro Pro Asp Ala Leu Ile Ser Lys Ile Ala
 130 135 140
 Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly Gln Asn Trp Leu Leu Asp Glu Gln
 145 150 155 160
 Thr Ser Thr Leu Thr Arg Leu Arg Tyr Ser Tyr Arg Val Ile Cys Ser
 165 170 175
 Asp Asn Tyr Tyr Gly Asp Asn Cys Ser Arg Leu Cys Lys Lys Arg Asn
 180 185 190
 Asp His Phe Gly His Tyr Val Cys Gln Pro Asp Gly Asn Leu Ser Cys
 195 200 205
 Leu Pro Gly Trp Thr Gly Glu Tyr Cys Gln Gln Pro Ile Cys Leu Ser
 210 215 220
 Gly Cys His Glu Gln Asn Gly Tyr Cys Ser Lys Pro Ala Glu Cys Leu
 225 230 235 240
 Cys Arg Pro Gly Trp Gln Gly Arg Leu Cys Asn Glu Cys Ile Pro His
 245 250 255
 Asn Gly Cys Arg His Gly Thr Cys Ser Thr Pro Trp Gln Cys Thr Cys
 260 265 270
 Asp Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asp Gln Asp Leu Asn Tyr Cys
 275 280 285
 Thr His His Ser Pro Cys Lys Asn Gly Ala Thr Cys Ser Asn Ser Gly
 290 295 300
 Gln Arg Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Arg Pro Gly Tyr Thr Gly Val Asp
 305 310 315 320
 Cys Glu Leu Glu Leu Ser Glu Cys Asp Ser Asn Pro Cys Arg Asn Gly
 325 330 335
 Gly Ser Cys Lys Asp Gln Glu Asp Gly Tyr His Cys Leu Cys Pro Pro
 340 345 350
 Gly Tyr Tyr Gly Leu His Cys Glu His Ser Thr Leu Ser Cys Ala Asp
 355 360 365
 Ser Pro Cys Phe Asn Gly Gly Ser Cys Arg Glu Arg Asn Gln Gly Ala

ES 2 668 900 T3

	370					375						380					
	Asn	Tyr	Ala	Cys	Glu	Cys	Pro	Pro	Asn	Phe	Thr	Gly	Ser	Asn	Cys	Glu	
	385					390					395					400	
	Lys	Lys	Val	Asp	Arg	Cys	Thr	Ser	Asn	Pro	Cys	Ala	Asn	Gly	Gly	Gln	
					405					410					415		
	Cys	Leu	Asn	Arg	Gly	Pro	Ser	Arg	Met	Cys	Arg	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	
				420					425					430			
	Thr	Gly	Thr	Tyr	Cys	Glu	Leu	His	Val	Ser	Asp	Cys	Ala	Arg	Asn	Pro	
			435						440					445			
	Cys	Ala	His	Gly	Gly	Thr	Cys	His	Asp	Leu	Glu	Asn	Gly	Leu	Met	Cys	
		450					455					460					
	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Ser	Gly	Arg	Arg	Cys	Glu	Val	Arg	Thr	Ser	
	465				470						475					480	
	Ile	Asp	Ala	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Phe	Asn	Arg	Ala	Thr	Cys	Tyr	
				485						490					495		
	Thr	Asp	Leu	Ser	Thr	Asp	Thr	Phe	Val	Cys	Asn	Cys	Pro	Tyr	Gly	Phe	
			500						505					510			
	Val	Gly	Ser	Arg	Cys	Glu	Phe	Pro	Val	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Phe	Pro	
			515					520					525				
	Trp	Val	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Val	Gly	Leu	Ala	Val	Leu	Leu	Val	Leu	
		530					535						540				
	Leu	Gly	Met	Val	Ala	Val	Ala	Val	Arg	Gln	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Pro	
	545					550					555					560	
	Asp	Asp	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Leu	Ser	Asp	Phe	Gln	Lys	
				565						570					575		
	Asp	Asn	Leu	Ile	Pro	Ala	Ala	Gln	Leu	Lys	Asn	Thr	Asn	Gln	Lys	Lys	
			580						585					590			
	Glu	Leu	Glu	Val	Asp	Cys	Gly	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Cys	Gly	Lys	Gln	
			595					600					605				
	Gln	Asn	His	Thr	Leu	Asp	Tyr	Asn	Leu	Ala	Pro	Gly	Pro	Leu	Gly	Arg	
		610					615						620				
	Gly	Thr	Met	Pro	Gly	Lys	Phe	Pro	His	Ser	Asp	Lys	Ser	Leu	Gly	Glu	
	625					630						635				640	
	Lys	Ala	Pro	Leu	Arg	Leu	His	Ser	Glu	Lys	Pro	Glu	Cys	Arg	Ile	Ser	
				645							650				655		
	Ala	Ile	Cys	Ser	Pro	Arg	Asp	Ser	Met	Tyr	Gln	Ser	Val	Cys	Leu	Ile	
			660					665						670			
	Ser	Glu	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Val	Ile	Ala	Thr	Glu	Val				
			675					680					685				

<210> 10
 <211> 6
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

10 <400> 10

Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 1 5

15 <210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 11

ES 2 668 900 T3

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5

5 <210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 12

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica que comprende:

- 5 (a) 25 mg/ml \pm 3,75 mg/ml de un anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente al ligando 4 de tipo delta humano (DII4);
 (b) 10 mM \pm 1,5 mM de fosfato, pH 6 \pm 0,5;
 (c) un 0,2 % \pm 0,03 % de polisorbato 20;
 (d) 150 mM \pm 22,5 mM de cloruro de sodio; y
 10 (e) un 10 % \pm 1,5 % de sacarosa, en la que:

- (a) el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada (HCVD) de la SEQ ID NO: 1 y un dominio variable de cadena ligera (LCVD) de la SEQ ID NO: 5;
 (b) el anticuerpo tiene un peso molecular de aproximadamente 150 kDa; y
 15 (c) de aproximadamente un 82 % a aproximadamente un 87 % de los anticuerpos está fucosilados.

2. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, que consiste en (a) 25 mg/ml \pm 3,75 mg/ml del anticuerpo, (b) 10 mM \pm 3 mM de fosfato, pH 6 \pm 0,5, (c) un 0,2 % \pm 0,03 % de polisorbato 20, (d) 150 mM \pm 22,5 mM de cloruro de sodio y (e) un 10 % \pm 1,5 % de sacarosa, en agua.

- 20 3. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, en la que al menos un 94 % del anticuerpo tiene conformación nativa después de 28 días de almacenamiento a 45 °C; y/o
 en la que al menos un 45 % del anticuerpo es la forma de carga principal del anticuerpo después de 28 días de almacenamiento a 45 °C; y/o
 25 en la que al menos un 97 % del anticuerpo tiene una conformación nativa después de 28 días de almacenamiento a 25 °C; y/o
 en la que al menos un 57 % del anticuerpo es la forma de carga principal del anticuerpo después de 28 días de almacenamiento a 25 °C; y/o
 en la que al menos un 97 % del anticuerpo tiene conformación nativa después de 28 días de almacenamiento a
 30 37 °C; y/o
 en la que al menos un 51 % del anticuerpo es la forma de carga principal del anticuerpo después de 28 días de almacenamiento a 37 °C; y/o
 en la que al menos un 98 % del anticuerpo tiene conformación nativa después de seis meses de almacenamiento a
 35 5 °C; y/o
 en la que al menos un 61 % del anticuerpo es la forma de carga principal del anticuerpo después de seis meses de almacenamiento a 5 °C; y/o
 en la que la potencia relativa porcentual del anticuerpo después de seis meses de almacenamiento a 5 °C es al menos un 100 % de la potencia del anticuerpo antes del almacenamiento; y/o
 en la que al menos un 99 % del anticuerpo tiene conformación nativa después de seis meses de almacenamiento a -
 40 80 °C; y/o
 en la que al menos un 57 % del anticuerpo es la forma de carga principal del anticuerpo después de seis meses de almacenamiento a -80 °C; y/o
 en la que la potencia relativa porcentual del anticuerpo después de seis meses de almacenamiento a -80 °C es al menos un 100 % de la potencia del anticuerpo antes del almacenamiento; y/o
 45 en la que al menos un 99 % del anticuerpo tiene conformación nativa después de seis meses de almacenamiento a -30 °C; y/o
 en la que al menos un 57 % del anticuerpo es la variante de carga principal del anticuerpo después de seis meses de almacenamiento a -30 °C; y/o
 en la que la potencia relativa porcentual del anticuerpo después de seis meses de almacenamiento a -30 °C es al menos un 65 % de la potencia del anticuerpo antes del almacenamiento; y/o
 50 en la que al menos un 98 % del anticuerpo tiene conformación nativa después de seis meses de almacenamiento a -20 °C; y/o
 en la que al menos un 60 % del anticuerpo es la variante de carga principal del anticuerpo después de seis meses de almacenamiento a -20 °C; y/o
 55 en la que la potencia relativa porcentual del anticuerpo después de seis meses de almacenamiento a -20 °C es al menos un 100 % de la potencia del anticuerpo antes del almacenamiento.

4. Una composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha composición está contenida en un recipiente, preferiblemente

- 60 (a) en la que el recipiente es un vial, más preferiblemente en la que el vial es de vidrio; o
 (b) en la que el recipiente es una bolsa de gotero IV, preferiblemente en la que la bolsa hecha de poli(cloruro de vinilo) o poliolefina.

65 5. Un kit que comprende una composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, un recipiente e instrucciones, preferiblemente en el que el recipiente es un vial de vidrio equipado con un tapón de caucho

recubierto con fluorocarbono.