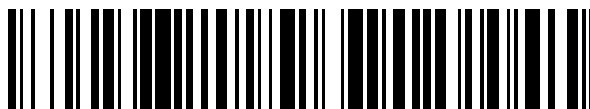


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 761**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/10 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2013 PCT/US2013/041532**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13173687**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2013 E 13724493 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2849723**

54 Título: **Formulaciones de anticuerpos monoclonales de alta concentración**

30 Prioridad:

18.05.2012 US 201261649146 P

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

21.09.2018

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**ARMSTRONG, NICHOLAS J.;
BOWEN, MAYUMI N. y
MAA, YUH-FUN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 682 761 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 de anticuerpos monoclonales de alta concentración

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a formulaciones de anticuerpos monoclonales de alta concentración adecuadas para la administración subcutánea, por ejemplo, a través de una jeringa precargada. En particular, la invención se refiere a una formulación que comprende un anticuerpo monoclonal secado por pulverización a una concentración de aproximadamente 200 mg/ml o más suspendido en un vehículo de suspensión no acuoso, en la que la viscosidad del vehículo de la suspensión es inferior a aproximadamente 20 centipoise. La invención también se refiere a un dispositivo de administración subcutánea con la formulación dentro del mismo, un método de fabricación de la formulación de suspensión, un método de fabricación de un artículo de fabricación que comprende la formulación de suspensión, el uso de la formulación de suspensión en la preparación de un medicamento y un método de tratamiento de un paciente con la formulación de suspensión.

Antecedentes de la invención

La administración ambulatoria de anticuerpos monoclonales en dosis altas (varios mg por kg) a través de inyección subcutánea (SC) es una forma preferida de entrega para el tratamiento de afecciones crónicas (Stockwin y Holmes, *Expert Opin Biol Ther* 3: 1133-1152 (2003); Shire *et al.*, *J Pharm Sci* 93:1390-1402 (2004)). La vía de administración subcutánea que requiere inyecciones usando jeringas, autoinyectores u otros dispositivos generalmente restringe la formulación del producto con respecto al volumen de inyección y la viscosidad de la solución y las funcionalidades del dispositivo en términos de fuerza de inyección y tiempo. Para la entrega de altas dosis de anticuerpos monoclonales con limitaciones de tiempo de inyección, volumen y fuerza, se requiere una formulación de anticuerpo monoclonal de alta concentración (100 mg/ml o más) para la administración subcutánea (Stockwin y Holmes, *Expert Opin Biol Ther* 3: 1133-1152 (2003); Shire *et al.*, *J Pharm Sci* 93: 1390-1402 (2004)). Un posible desafío en el desarrollo de formulaciones de alta concentración de proteínas es la viscosidad de la solución dependiente de la concentración. La fuerza de inyección (o la fuerza de deslizamiento) es un factor complejo influenciado por la viscosidad de la solución, el tamaño de la aguja (es decir, el calibre de la aguja) y la tensión superficial del recipiente/cierre. Las agujas más pequeñas, por ejemplo, $\geq$ calibre 26, presentarán menos sensación de dolor a los pacientes. Overcashier y sus colaboradores establecieron una relación de fuerza de deslizamiento-viscosidad en función del calibre de aguja basada en la ecuación de Hagen-Poiseuille (Overcashier *et al.*, *Am. Pharm Rev.* 9 (6): 77-83 (2006)). Con una aguja de pared delgada de calibre 27 (TW, por sus siglas en inglés) (DI, mín.: 0,241 mm), la viscosidad del líquido debe mantenerse por debajo de 20 centipoise con el fin de no superar la fuerza de deslizamiento de 20 Newton. Desafortunadamente, los científicos de formulación se enfrentan constantemente a una realidad conflictiva con la alta concentración de anticuerpos monoclonales y la alta viscosidad de la solución (Shire *et al.*, *J Pharm Sci* 93: 1390-1402 (2004); Kanai *et al.*, *J Pharm Sci* 97: 4219-4227 (2005)). Otro desafío con las formulaciones líquidas a una alta concentración de anticuerpos monoclonales es la estabilidad física de las proteínas. En general, se observan mayores tasas de agregación y una opalescencia indeseable en soluciones líquidas con alta concentración de anticuerpos monoclonales (Alford *et al.*, *J Pharm Sci* 97: 3005-3021 (2008); Salinas *et al.*, *J Pharm Sci* 99: 82-93 (2010); Sukumar *et al.*, *Pharm Res* 21: 1087-1093 (2004)).

Se han intentado diferentes estrategias de formulación para reducir la viscosidad de la solución líquida de anticuerpos monoclonales de alta concentración mediante la formulación con sal, aminoácidos o azúcar para equilibrar las fuerzas repulsivas y atractivas a través de fuerzas iónicas intermedias (Sukumar *et al.*, *Pharm Res* 21: 1087-1093 (2004); He *et al.*, *J Pharm Sci* 100: 1330-1340 (2011)). Sin embargo, la eficacia de estos enfoques puede estar limitada a una concentración de anticuerpos monoclonales superior a 100 mg/ml o debido a características específicas de ciertos anticuerpos monoclonales. Dani y sus colaboradores aplicaron el enfoque de reconstituir polvo de anticuerpos monoclonales secado por pulverización para preparar una solución líquida de alta concentración de anticuerpos monoclonales antes de la inyección subcutánea (Dani *et al.*, *J Pharm Sci* 96: 1504-1517 (2007)). Este enfoque puede ciertamente mejorar la estabilidad de la proteína en estado sólido durante toda la vida útil, sin embargo, el problema de la alta viscosidad permanece porque el polvo de anticuerpos monoclonales secado por pulverización necesita reconstituirse a una concentración de anticuerpo monoclonal alta antes de la inyección. Recientemente, un enfoque basado en polvo surgió usando suspensiones de partículas cristalinas de anticuerpos monoclonales (Yang *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* 100: 6934-6939 (2003); Trilisky *et al.*, "Crystallization and liquid-liquid phase separation of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins: Screening results", publicación en línea AICHE DOI 10, 1002/btrp.621 (publicado por Wiley Online Library) (2011)). Se basa en la percepción de que la viscosidad de una suspensión cristalina de anticuerpos monoclonales puede ser menor que la de una formulación líquida a la misma concentración de anticuerpos monoclonales. Sin embargo, no se presentaron datos de viscosidad o fuerza de inyección en estas referencias y este concepto siguió siendo especulativo. Además, la cristalización de anticuerpos monoclonales aún no es una plataforma de proceso madura aplicable a una amplia gama de anticuerpos monoclonales, aunque se han presentado algunos ejemplos satisfactorios (Trilisky *et al.*, "Crystallization and liquid-liquid phase separation of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins: Screening results", publicación en línea AICHE DOI 10, 1002/btrp.621 (publicado por Wiley Online Library) (2011)).

La presente invención representa un concepto diferente basado en polvo que emplea una suspensión de polvo de anticuerpos monoclonales de alta concentración en un vehículo de suspensión no acuoso. El enfoque de la suspensión se ha revisado exhaustivamente (Floyd y Jain, "*Injectable emulsions and suspensions*", en: *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems* Volumen 2 (editores Lieberman HA, Rieger MM, Banker GS). Dekker, NY, NY, páginas 261-318 (1996), Akers et al., *J Parent Sci & Techn* 41: 88-96 (1987)) y ha informado de suspensiones de microesferas/emulsión en aceites vegetales, tales como aceite de sésamo (Larsen et al., *Eur J Pharm Sci* 29: 348-354 (2006); Hirano et al., *J Pharm Sci* 71: 495-500 (1982)), aceite de soja (Salmerón et al., *Drug Dev Ind Pharm* 23: 133-136 (1997); Karasulu et al., *Drug Dev* 14: 225-233 (2007)) y aceite de cacahuete (Santucci et al., *J Contr Rel* 42: 157-164 (1996)) como inyectables parenterales. Las fuerzas físicas y químicas que influyen en las propiedades de las suspensiones no acuosas pueden ser bastante diferentes de las de la suspensión acuosa debido a la ausencia de efectos eléctricos asociados a la teoría DLVO (atracción de van der Waals y repulsión electrostática como resultado de la doble capa de contraiones).

Pena y colaboradores (Pena et al., *Intl J Pharm* 113: 89-96 (1995)) informaron de la caracterización reológica de suspensión de polvo de somatotropina bovina (rbSt) sin excipientes (liofilizada o secada por pulverización) en aceite de triglicérido caprílico/cáprico (MIGLYOL 812®) con o sin polisorbato 80. RbSt es un péptido de 191 aminoácidos con un peso molecular de 22.000 Dalton. Pena et al. determinaron que se observó una red formada entre las partículas de fármaco, polisorbato 80 y MIGLYOL 812® y una mayor viscosidad con el aumento de polisorbato 80 y las concentraciones de polvo. Estos estudios también descubrieron que la forma/morfología de las partículas desempeñaba un papel importante en la viscosidad de la suspensión. Las partículas esféricas más pequeñas (empaquetadas más densamente) secadas por pulverización dieron como resultado suspensiones más viscosas que el homólogo liofilizado que presentaba escamas de forma irregular más grandes.

El enfoque basado en polvo no acuoso para suspensiones de anticuerpos monoclonales de alta concentración sigue sin explorarse. Estudios con el pequeño péptido rbSt en Pena et al. no predecirían la capacidad de formular eficazmente un anticuerpo monoclonal tetramérico grande (aproximadamente 150.000 Dalton). Además, los vehículos de aceite utilizados por Pena et al. eran demasiado viscosos como para tenerse en cuenta para su uso en la administración de jeringas precargadas. La viscosidad de MIGLYOL 812®, aceite de sésamo, aceite de soja, aceite de cacahuete es de ~30 centipoise (cP) a 25 °C, 43 cP a 25 °C, 50 cP a 25 °C y 35 cP a 37 °C, respectivamente. Además, Pena et al. determinó que el rendimiento de la suspensión del polvo secado por pulverización era inferior a la de su homólogo liofilizado.

Las publicaciones que describen formulaciones de anticuerpos monoclonales incluyen: la Patente de los EE.UU. 6.284.282 (Maa et al.); las Patentes de los EE.UU. N.º 6.267.958 y 6.685.940 (Andya et al.); la Patente de los EE.UU. N.º 6.171.586 (Lam et al.); las Patentes de los EE.UU. N.º 6.875.432 y 7.666.413 (Liu et al.); el documento WO2006/044908 (Andya et al.); el documento US-2011-0076273-A1 (Adler et al.); el documento US 2011/0044977 y el documento WO 2011/012637 (Adler et al.); el documento US 2009/0226530A1 (Lassner et al.); el documento US-A 2003/0190316 (Kakuta et al.); el documento US-A 2005/0214278 y el documento US-A 2005/0118163 (Mizushima et al.); el documento US-A 2009/0291076 (Morichika et al.); y el documento US-A 2010/0285011 (Imaeda et al.)

Sumario de la invención

Los objetivos del presente estudio fueron: (1) identificar los parámetros del proceso que dictan el rendimiento de la suspensión; (2) evaluar la viabilidad de establecer suspensiones de polvo de anticuerpos monoclonales (es decir, ≥ 250 mg de anticuerpo monoclonal/ml) con una inyectabilidad aceptable (es decir, fuerza de inyección ≤ 20 N a través de una aguja de pared delgada (TW, por sus siglas en inglés) de calibre 27) y una estabilidad física de la suspensión; y/o (3) comprender el mecanismo de rendimiento de la suspensión. Para preparar polvos de anticuerpos monoclonales, se usó secado por pulverización. El secado por pulverización es un proceso de fabricación maduro, escalable y eficiente. El efecto a corto plazo del secado por pulverización sobre el anticuerpo monoclonal se estudió a temperatura acelerada. Un criterio importante para la selección del vehículo de suspensión era que la viscosidad del vehículo de suspensión fuera inferior a 10 centipoise (cP). Los tres vehículos de suspensión modelo, dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, benzoato de bencilo y lactato de etilo, sometidos a ensayo en el presente estudio tienen una baja viscosidad y satisfacen este requisito.

Se ha usado cromatografía de gases inversa (CGI) para el análisis de energía superficial (AES) (Newell et al., *Pharm Res* 18: 662-666 (2001); Grimsey et al., *J Pharm Sci* 91: 571-583 (2002); Newell y Buckton, *Pharm Res* 21: 1440-1444 (2004); Saleem y Smyth, *Drug Devel & Ind Pharm* 34: 1002-1010 (2008); Panzer y Schreiber, *Macromolecules* 25: 3633-3637 (1992)). En la CGI, se inyecta una sonda en una columna empaquetada con el polvo de interés (fase estacionaria) y el tiempo requerido para que la sonda pase a través de la columna (t_r) es una medida de la magnitud de la interacción entre la sonda y la fase estacionaria. La energía superficial normalmente puede dividirse en componentes polares y dispersivos (no polares). Por tanto, el uso de sondas no polares (alcanos) y polares (donadores-aceptores de electrones o disolventes ácido-base) permitió cuantificar estos dos componentes de energía de superficie. Las energías superficiales de las partículas secadas por pulverización pueden servir como un indicador más directo y pertinente para el rendimiento de la suspensión que otras características de las partículas. Otro parámetro es el calor de sorción, que es una medida directa de la fuerza de las interacciones entre un sólido y moléculas de gas adsorbidas en la superficie (Thielmann F., "Inverse gas chromatography: Characterization of

alumina and related surfaces", en *"Enciclopedia of Surface and Colloid Science"* Volumen 4 (edición de P. Somasundaran). CRC Press, Boca Ratón, FL., páginas 3009-3031 (2006); Thielmann y Butler, *"Heat of sorption on microcrystalline cellulose by pulse inverse gas chromatography at infinite dilution"*, en Nota de Solicitud de Servicios de Medición de Superficie 203 (http://www.thesorptionssolution.com/Information_Application_Notes_IGC.php#Aps) (2007)). El método de CGI se empleó para medir el calor de sorción entre las partículas secadas por pulverización y el vehículo de suspensión en el presente estudio.

Los datos experimentales en el presente documento demuestran que se alcanzaron los objetivos y se desarrollaron formulaciones de suspensión de anticuerpos monoclonales de alta concentración adecuadas para la administración subcutánea.

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a una formulación de suspensión que comprende un anticuerpo monoclonal secado por pulverización a una concentración de aproximadamente 200 mg/ml o más suspendido en un vehículo de suspensión no acuoso, en el que la viscosidad del vehículo de suspensión es inferior a aproximadamente 20 centipoise, como se define en las reivindicaciones.

En otro aspecto, la invención se refiere a una formulación de suspensión que comprende un anticuerpo monoclonal IgG1 de longitud completa humano secado por pulverización a una concentración de aproximadamente 200 mg/ml a aproximadamente 400 mg/ml suspendido en un vehículo de suspensión no acuoso con una viscosidad inferior a aproximadamente 20 centipoise, en la que la formulación tiene un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 2 micrómetros a aproximadamente 10 micrómetros y una fuerza de deslizamiento de la inyección inferior a aproximadamente 15 Newton, como se define en las reivindicaciones.

La invención se refiere adicionalmente a un dispositivo de administración subcutánea (por ejemplo, una jeringa precargada) con la formulación dentro del mismo.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de fabricación de una suspensión que comprende suspender un anticuerpo monoclonal secado por pulverización en un vehículo de suspensión no acuoso con una viscosidad inferior a aproximadamente 20 centipoise, en el que la concentración de anticuerpo en la formulación de suspensión es de aproximadamente 200 mg/ml o más, como se define en las reivindicaciones.

Adicionalmente, la invención proporciona un método de fabricación de un artículo de fabricación que comprende cargar un dispositivo de administración subcutánea con la formulación del presente documento.

En aspectos relacionados, la invención se refiere al uso de la formulación en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que necesita tratamiento con el anticuerpo monoclonal de la formulación, así como la formulación para su uso en un método de tratamiento de un paciente que comprende la administración de la formulación a un paciente que necesita tratamiento con el anticuerpo monoclonal de la formulación.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Estabilidad del anticuerpo (como cambio de monómero en % por cromatografía de exclusión por tamaño (CET) desde justo después del secado por pulverización) en función del tiempo de almacenamiento a 40 °C para una formulación de bevacizumab/trehalosa secada por pulverización (●) y secada por congelación (○) así como para una formulación de trastuzumab/trehalosa secada por pulverización (■) y liofilizada por congelación (□).

Figura 2: Los perfiles de viscosidad-concentración de polvo para suspensiones de dicaprilato/dicaprato de propilenglicol con tres polvos de anticuerpos monoclonales (mAb) secados por pulverización con un secador por pulverización a escala piloto o a escala experimental: bevacizumab por escala piloto (◇), bevacizumab por escala experimental (◆), trastuzumab por escala piloto (□), trastuzumab por escala experimental (■), rituximab por escala piloto (Δ), rituximab por escala experimental (▲), ajuste empírico (línea continua) y ajuste teórico a partir de la Ecuación 4 (línea de trazos).

Figura 3: Los perfiles de fuerza de deslizamiento-concentración de mAb para una suspensión de polvo de rituximab en dicaprilato/dicaprato de propilenglicol (Δ), lactato de etilo (◇), benzoato de bencilo (○) y fuerza de deslizamiento prevista para una solución líquida de mAb extraída de la Figura 4 en Overcashier et al. *Am. Pharm. Rev.* 9 (6): 77-83 (2006) (■).

Figura 4: Los perfiles de viscosidad-concentración de mAb para la suspensión de polvo de rituximab en dicaprilato/dicaprato de propilenglicol (Δ), en benzoato de bencilo (◇) y en lactato de etilo (○).

Figura 5: Distribución de tamaño de partícula de suspensiones de rituximab en dicaprilato/dicaprato de propilenglicol (◇), en benzoato de bencilo (□) y en lactato de etilo (Δ).

Figuras 6A-C: Fotografías de suspensión de rituximab a 150 mg/ml en lactato de etilo después de 2 semanas de almacenamiento (6A), en lactato de etilo agitado con formación de vórtice después de 1 día de almacenamiento (6B) y en dicaprilato/dicaprato de propilenglicol después de 2 semanas de almacenamiento (6C). (Nota: la cinta no es parte de la suspensión, pero se usa para enfoque óptico durante la toma de fotografías).

Figuras 7A y 7B: Suspensiones de rituximab. Figura 7A: Distribución de tamaño de partícula de suspensiones de rituximab en mezclas de dicaprilato/dicaprato de propilenglicol y lactato de etilo a 100/0 (◇), 75/25 (■), 50/50 (□),

25/75 (♦) y 0/100 (Δ). Figura 7B: Fotografía de suspensión de rituximab en mezcla 75/25 de dicaprilato/dicaprato de propilenglicol/lactato de etilo después de 2 semanas de almacenamiento. (Nota: la cinta no es parte de la suspensión, pero se usa para enfoque óptico durante la toma de fotografías).

Las Figuras 8A y 8B proporcionan las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada (SEQ ID No. 1) y la cadena ligera (SEQ ID No. 2) de anticuerpo rituximab. Se identifican cada una de las regiones marco conservadas (FR, por sus siglas en inglés) y cada una de las regiones de región determinante de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) en cada región variable, así como la secuencia constante de la cadena pesada 1 gamma humana y la secuencia constante de la cadena ligera kappa humana. La región pesada variable (VH, por sus siglas en inglés) está en la SEQ ID No. 3. La región ligera variable (VL, por sus siglas en inglés) está en la SEQ ID No. 4. Los identificadores de secuencia para las CDR son: CDR H1 (SEQ ID No. 5), CDR H2 (SEQ ID No. 6), CDR H3 (SEQ ID No. 7), CDR L1 (SEQ ID No. 8), CDR L2 (SEQ ID No. 9) y CDR L3 (SEQ ID No. 10).

Las Figuras 9A y 9B. proporcionar las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada (SEQ ID No. 11) y la cadena ligera (SEQ ID No. 12) del anticuerpo bevacizumab. El final de cada región variable se indica con ||. La región pesada variable (VH, por sus siglas en inglés) está en la SEQ ID No. 13. La región ligera variable (VL, por sus siglas en inglés) está en la SEQ ID No. 14. Cada una de las tres CDR en cada región variable está subrayada. Los identificadores de secuencia para las CDR son: CDR H1 (SEQ ID No. 15), CDR H2 (SEQ ID No. 16), CDR H3 (SEQ ID No. 17), CDR L1 (SEQ ID No. 18), CDR L2 (SEQ ID No. 19) y CDR L3 (SEQ ID No. 20).

Las Figuras 10A y 10B proporcionan las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada (SEQ ID No. 21) y la cadena ligera (SEQ ID No. 22) del anticuerpo trastuzumab. El final de cada región variable se indica con ||. La región variable pesada (VH, por sus siglas en inglés) está en la SEQ ID No. 23. La región ligera variable (VL, por sus siglas en inglés) está en la SEQ ID No. 24. Cada una de las tres CDR en cada región variable está subrayada. Los identificadores de secuencia para las CDR son: CDR H1 (SEQ ID No. 25), CDR H2 (SEQ ID No. 26), CDR H3 (SEQ ID No. 27), CDR L1 (SEQ ID No. 28), CDR L2 (SEQ ID No. 29) y CDR L3 (SEQ ID No. 30).

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

I. Definiciones

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en un tipo de forma que permite que la actividad biológica del agente activo (por ejemplo, anticuerpo monoclonal) sea eficaz y que no contenga componentes adicionales que son inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación. Dichas formulaciones son estériles. En una realización, la formulación farmacéutica es adecuada para la administración subcutánea.

"Farmacéuticamente aceptable" con respecto a un excipiente en una formulación farmacéutica significa que el excipiente es adecuado para la administración a un paciente humano.

Una formulación "estéril" es aséptica o está libre de todos los microorganismos vivos y sus esporas.

La "administración subcutánea" se refiere a la administración (de una formulación) bajo la piel de un sujeto o paciente.

Una formulación "estable" es una en la que el agente activo (por ejemplo, anticuerpo monoclonal) retiene esencialmente en la misma su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica tras la suspensión y/o el almacenamiento. Preferentemente, la formulación retiene esencialmente su estabilidad física y química, así como su actividad biológica tras la suspensión y el almacenamiento. El período de almacenamiento generalmente se selecciona en función de la vida útil prevista de la formulación. Hay disponibles diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de proteínas en la técnica y se revisan en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Editor, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Nueva York, Pubs. (1991); y Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993), por ejemplo. En una realización, la estabilidad de la formulación de suspensión se evalúa alrededor del tiempo en el que las partículas secadas por pulverización se suspenden en el vehículo para producir la formulación de suspensión. En una realización, la estabilidad puede evaluarse cuando la formulación se mantiene a una temperatura seleccionada durante un período de tiempo seleccionado. En una realización, la estabilidad del anticuerpo monoclonal se evalúa mediante distribución de tamaño (porcentaje de monómero, agregación y/o fragmentación) antes y después del secado por pulverización (por ejemplo, antes y después del secado por pulverización durante 3 meses de almacenamiento a la temperatura acelerada de 40 °C). En una realización, la distribución del tamaño se evalúa usando cromatografía de exclusión por tamaño-cromatografía líquida de alta resolución (CET-HPLC). En una realización, el porcentaje de pérdida de monómero (según se mide por CET-HPLC) durante 3 meses es inferior a aproximadamente el 10 %, por ejemplo, inferior al 5 %, por ejemplo, a una temperatura acelerada de 40 °C. En una realización, la estabilidad se evalúa mediante la evaluación la estabilidad física de la suspensión, por ejemplo, inspección visual de la velocidad de sedimentación y/o sedimentación de partículas.

"Secado por pulverización" se refiere al proceso de atomización y secado de un líquido o suspensión que comprende una proteína o anticuerpo monoclonal usando gas (normalmente aire o nitrógeno) a una temperatura superior a la temperatura ambiente para producir partículas de polvo seco que comprenden la proteína o anticuerpo monoclonal.

Durante el proceso, el líquido se evapora y se forman partículas secas. En una realización, el secado por pulverización se realiza usando un secador por pulverización, por ejemplo, que tiene una temperatura de entrada de aire de aproximadamente 100 °C a aproximadamente 220 °C y una temperatura de salida de aire de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 100 °C. Las partículas pueden separarse del gas mediante diversos métodos tales como ciclón, gas a alta presión, carga electrostática, etc. Esta definición de secado por pulverización en el presente documento excluye expresamente el secado por congelación o la cristalización del anticuerpo monoclonal.

Una partícula, proteína o anticuerpo monoclonal "secos" de la presente invención se ha sometido a un proceso de secado de manera que su contenido de agua se ha reducido significativamente. En una realización, la partícula, proteína o anticuerpo monoclonal tiene un contenido de agua inferior a aproximadamente el 10 %, por ejemplo, inferior a aproximadamente el 5 %, por ejemplo, donde el contenido de agua se mide mediante un método de titulación química (por ejemplo, método de Karl Fischer) o un método de pérdida de peso (calefacción a alta temperatura).

Para los fines del presente documento, una "preparación secada previamente por pulverización" se refiere a una preparación del anticuerpo monoclonal (por lo general un anticuerpo monoclonal producido recombinantemente que ha sido sometido a una o más etapas de purificación) y uno o más excipientes, tales como estabilizadores (por ejemplo, sacáridos, tensioactivos y/o aminoácidos) y, opcionalmente, un tampón. En una realización, la preparación está en forma líquida. En una realización, la preparación está congelada.

Una "formulación de suspensión" es una formulación líquida que comprende partículas sólidas (por ejemplo, partículas de anticuerpos monoclonales secadas por pulverización) dispersadas en toda una fase líquida en la que no son solubles. En una realización, las partículas sólidas en la formulación de suspensión tienen un diámetro de partícula promedio de aproximadamente 2 a aproximadamente 30 micrómetros, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 micrómetros (por ejemplo, como se analiza por difracción láser). Opcionalmente, las partículas sólidas en la formulación de suspensión tienen un tamaño de partícula máximo (porcentaje más alto) inferior a aproximadamente 30 micrómetros y, opcionalmente, inferior a aproximadamente 10 micrómetros (por ejemplo, según se analiza por difracción láser). La formulación de suspensión puede prepararse mediante la combinación de partículas de anticuerpos monoclonales secadas por pulverización con un vehículo de suspensión no acuoso. En una realización, la formulación de suspensión está adaptada o es adecuada para la administración subcutánea a un sujeto o paciente.

Como se usa en el presente documento, "vehículo de suspensión no acuoso" se refiere a un líquido farmacéuticamente aceptable que no es a base de agua y en el que las partículas de anticuerpo monoclonal secadas por pulverización pueden suspenderse con el fin de generar una formulación de suspensión. En una realización, el vehículo comprende un lípido líquido o éster de ácido graso o alcohol (por ejemplo, dicaprilato/dicaprato de propilenglicol), u otro compuesto orgánico tal como benzoato de bencilo o lactato de etilo. El vehículo de la presente invención incluye mezclas de dos o más líquidos, tales como una mezcla de dicaprilato/dicaprato de propilenglicol y lactato de etilo. Preferentemente, el vehículo de suspensión no acuoso tiene una viscosidad (a 25 °C) inferior a aproximadamente 20 centipoise (cP), opcionalmente inferior a aproximadamente 10 cP, y, en una realización, inferior a aproximadamente 5 cP. Los ejemplos de vehículos de suspensión no acuosos incluyen los vehículos de la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1-Vehículos de suspensión no acuosos de ejemplo y su viscosidad

Vehículo	Viscosidad (cP)
Etanol	1,3 (25 °C)
Dimetilsulfóxido	2,0 (20 °C)
N -metil-2-pirrolidona	1,66 (25 °C)
Acetona	0,33 (20 °C)
Benzoato de bencilo	9 (25 °C)
Alcohol tetrahidrofurfurílico	6,2 (25 °C)
Dimetiléter de dietilenglicol (Diglym)	1,2 (15 °C)
Lactato de etilo	2 (20 °C)
Oleato de etilo	7,4 (20 °C)
Miristato de isopropilo	5,7 (20 °C)
Dicaprilato/dicaprato de propilenglicol (MIGLYOL 840®)	9 (25 °C)

"Viscosidad" se refiere a la medida de la resistencia de un fluido que se deforma por tensión de cizalla o tensión de tracción; puede evaluarse usando un viscosímetro o reómetro. A menos que se indique lo contrario, la medición de la viscosidad (centipoise, cP) es aquella a aproximadamente 25 °C. La viscosidad como se usa en el presente documento puede referirse a la del vehículo de suspensión no acuoso en sí o al de la formulación de suspensión.

"Inyectabilidad" se refiere a la facilidad con que la formulación de suspensión puede administrarse a un sujeto. De acuerdo con una realización de la invención, la inyectabilidad de una formulación de suspensión dada puede ser superior a la inyectabilidad de una formulación líquida que comprende la misma concentración de anticuerpo monoclonal y el mismo excipiente o excipientes y la concentración o concentraciones de los mismos. En una realización, la inyectabilidad se refiere a la fuerza de deslizamiento de inyección.

La "fuerza de deslizamiento de inyección" como se usa en el presente documento se refiere a la fuerza necesaria para la inyección de una solución a una velocidad de inyección dada a través de una aguja de calibre y longitud predeterminados. En una realización, se evalúa usando una jeringa precargada (jeringa de 10 ml de longitud con aguja de calibre ≤ 25 o preferentemente aguja de calibre ≤ 27) analizando la fuerza de deslizamiento y estableciéndose como una función de la distancia del vástago del émbolo que se desplaza dentro la jeringa a una tasa de compresión constante (por ejemplo, usando "Medición de la Fuerza de Deslizamiento de la Jeringa" como en el Ejemplo del presente documento). El tiempo y la fuerza necesarios para una inyección manual (o el tiempo necesario para una inyección usando un autoinyector) pueden afectar a la usabilidad del producto por parte del usuario final (y, por tanto, el cumplimiento con el uso previsto del producto). En una realización, la ecuación de Hagen-Poiseuille se utiliza para estimar la fuerza de desplazamiento (o deslizamiento) (Ecuación 1).

$$F = \frac{8Q\mu L}{\pi R^4} \times A \quad (\text{Ecuación 1})$$

Q = Caudal volumétrico
 μ = Viscosidad del fluido
 L = Longitud de la aguja
 R = Diámetro interno de la aguja
 A = Área de la sección transversal del émbolo de la jeringa
 F = Fuerza de desplazamiento sin fricción

De acuerdo con la Ecuación 1, la fuerza de deslizamiento depende de una serie de parámetros. El único parámetro en el que un científico de formulación puede influir es la viscosidad. Todos los demás parámetros (diámetro interno de la aguja, longitud de la aguja y área de la sección transversal del émbolo de la jeringa) están determinados por la propia jeringa precargable. Las formulaciones con una alta viscosidad pueden conducir a fuerzas de inyección altas y tiempos de inyección largos puesto que ambos parámetros son proporcionales a la viscosidad. Los límites generalmente aceptados para la fuerza de inyección y el tiempo de inyección pueden depender, por ejemplo, de la indicación y la destreza de la población de pacientes. En una realización ejemplificada en el presente documento, los parámetros de la Ecuación 1 fueron:

Q = Caudal volumétrico = 0,1 ml/segundo
 μ = Viscosidad del fluido = 20 centipoise
 L = longitud de la aguja = 1,25 cm
 R = diámetro interior de la aguja = 0,0105 cm (aguja de calibre 27)
 A = Área de la sección transversal del émbolo de la jeringa = 0,00316 cm²
 F = fuerza de desplazamiento sin fricción = 16,6 x 10⁵ dina = 16,6 Newton

En una realización, la fuerza de deslizamiento de inyección se determina como una función de la concentración de anticuerpos monoclonales mediante la inyección de 1 ml de formulación de suspensión usando una jeringa de 1 ml de largo a través de una aguja de calibre 27 de pared delgada (TW, por sus siglas en inglés) en 10 segundos.

En una realización, la fuerza de deslizamiento de inyección de la formulación de suspensión es de aproximadamente 20 Newton o menos.

En una realización, la fuerza de deslizamiento de inyección de la formulación de suspensión es de aproximadamente 15 Newton o menos.

En una realización, la fuerza de deslizamiento de la inyección es de aproximadamente 2 Newton a aproximadamente 20 Newton.

En una realización, la fuerza de deslizamiento de inyección es de aproximadamente 2 Newton a aproximadamente 15 Newton.

En una realización, la fuerza de deslizamiento de la inyección es inferior a aproximadamente 20 Newton.

En una realización, la fuerza de deslizamiento de la inyección es inferior a aproximadamente 15 Newton.

Como se usa en el presente documento, "tampón" se refiere a una solución tamponada que resiste los cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base. El tampón de la presente invención (si se usa)

generalmente tiene un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 8,0, por ejemplo, de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0, por ejemplo, de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,2 y en una realización su pH es aproximadamente 6,0. Los ejemplos de tampones que controlarán el pH en este intervalo incluyen acetato, succinato, succinato, gluconato, histidina, citrato, glicilglicina y otros tampones de ácidos orgánicos. En una realización en el presente documento, el tampón es un tampón de histidina. Generalmente, se incluye un tampón en la preparación secada previamente por pulverización y puede estar presente en la formulación de suspensión preparada a partir de la misma (pero no se requiere en la misma).

Un "tampón de histidina" es un tampón que comprende iones de histidina. Los ejemplos de tampones de histidina incluyen cloruro de histidina, acetato de histidina, fosfato de histidina, sulfato de histidina. En una realización, el tampón de histidina es histidina-acetato o histidina-HCl. En una realización, el tampón de histidina tiene un pH de 5,5 a 6,5, opcionalmente un pH de 5,8 a 6,2, por ejemplo, un pH de 6,0.

El término "excipiente" se refiere a un agente que puede añadirse a una preparación o formulación, por ejemplo: como un estabilizador, para conseguir una consistencia deseada (por ejemplo, alterando las propiedades de volumen) y/o para ajustar la osmolalidad. Los ejemplos de excipientes en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, estabilizadores, azúcares, polioles, aminoácidos, tensioactivos, agentes quelantes y polímeros.

Un "estabilizador" en el presente documento es un excipiente, o mezcla de dos o más excipientes, que estabiliza una formulación farmacéutica. Por ejemplo, el estabilizador puede evitar la inestabilidad debido al secado por pulverización a temperatura elevada. Los estabilizadores de ejemplo del presente documento incluyen sacáridos, tensioactivos y aminoácidos.

Un "sacárido" en el presente documento comprende la composición general $(CH_2O)_n$ y derivados de la misma, incluyendo monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, polisacáridos, alcoholes de azúcar, azúcares reductores, azúcares no reductores, etc. Los ejemplos de sacáridos en el presente documento incluyen glucosa, sacarosa, trehalosa, lactosa, fructosa, maltosa, dextrano, glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitol, silitol, sorbitol, manitol, melibiosa, melecitosa, rafinosa, manotriosa, estaquiosa, maltosa, lactulosa, maltulosa, glucitol, maltitol, lactitol, isomaltulosa, etc. El sacárido preferido en el presente documento es un disacárido no reductor, tal como trehalosa o sacarosa.

En el presente documento, un "tensioactivo" se refiere a un agente tensioactivo, preferentemente un tensioactivo no iónico. Los ejemplos de tensioactivos en el presente documento incluyen polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20 y polisorbato 80); poloxámero (por ejemplo, poloxámero 188); Tritón; dodecilsulfato de sodio (SDS); lauril sulfato de sodio; octilglicósido de sodio; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sulfobetaina; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sarcosina; linoleilo, miristilo o cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil- o isostearamidopropil-betaína (por ejemplo, lauroamidopropilo); miristamidopropil-, palmidopropil- o isostearamidopropil-dimetilamina; metil cocoil-taurato de sodio o metil oleil-taurato disódico; y la serie MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, Nueva Jersey); polietilglicol, polipropilglicol y copolímeros de etileno y propilenglicol (por ejemplo, Pluronic, PF68, etc.); etc. En una realización, el tensioactivo es polisorbato 20 o polisorbato 80. El tensioactivo puede incluirse para evitar o reducir la agregación o desnaturalización del anticuerpo monoclonal en la preparación y/o formulación.

El término "aminoácido" como se usa en el presente documento denota una molécula orgánica farmacéuticamente aceptable que posee un resto amino localizado en posición α con respecto a un grupo carboxílico. Los ejemplos de aminoácidos incluyen: arginina, glicina, ornitina, lisina, histidina, ácido glutámico, ácido aspárgico, isoleucina, leucina, alanina, fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, serina y prolina. El aminoácido empleado está opcionalmente en la forma L. Los ejemplos de aminoácidos que pueden incluirse como estabilizadores en las preparaciones y/o formulaciones del presente documento incluyen: histidina, arginina, glicina y/o alanina.

Por "isotónico" se entiende que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas generalmente tendrán una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm. La isotonicidad puede medirse usando un osmómetro de presión de vapor o de tipo de congelación por hielo, por ejemplo.

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto las posibles variantes que puedan surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando dichas variantes generalmente presentes en cantidades menores. Al contrario que las preparaciones de anticuerpos policlonales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque no están contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usarán de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el método de hibridoma descrito por

primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975) o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por ejemplo. Los ejemplos específicos de anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos.

Un anticuerpo monoclonal "secado por pulverización" se ha sometido a secado por pulverización. El término incluye el anticuerpo monoclonal secado por pulverización en forma de polvo (es decir, antes de la suspensión) y en forma líquida (es decir, cuando se suspende en el vehículo de suspensión no acuoso para formar la formulación de suspensión).

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica o homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntica o homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, a condición de que muestren la actividad biológica deseada (Patente de los EE.UU. N.º 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del Viejo Mundo, tal como babuino, macaco de la India o macaco cangrejero) y secuencias de región constante humanas (Patente de los EE.UU. N.º 5.693.780). Un ejemplo de un anticuerpo quimérico en el presente documento es rituximab.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco conservada (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para perfeccionar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos un dominio variable y normalmente dos, en los que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, excepto por la sustitución o sustituciones de FR como se ha indicado anteriormente. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992). Los ejemplos de anticuerpos humanizados del presente documento incluyen trastuzumab y bevacizumab.

Un "anticuerpo humano" en el presente documento es uno que comprende una estructura de secuencia de aminoácidos que se corresponde con la estructura de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que puede obtenerse a partir de una célula B humana. Dichos anticuerpos pueden identificarse o prepararse mediante diversas técnicas, que incluyen, pero no se limitan a: la producción mediante animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, después de la inmunización, de producir anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena (véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993); y las Patentes de los EE.UU. N.º 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807); la selección de bibliotecas de expresión de fagos que expresan anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, McCafferty *et al.*, *Nature* 348: 552-553 (1990); Johnson *et al.*, *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564-571 (1993); Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991); Griffith *et al.*, *EMBOJ.* 12: 725-734 (1993); las Patentes de los EE.UU. N.º 5.565.332 y 5.573.905); la generación a través de células B activadas *in vitro* (véanse las Patentes de los EE.UU. 5.567.610 y 5.229.275); y el aislamiento de hibridomas productores de anticuerpos humanos. Un ejemplo de un anticuerpo humano en el presente documento es ofatumumab.

Un "anticuerpo multiespecífico" en el presente documento es un anticuerpo que tiene especificidades de unión para dos o más epítomos diferentes.

Un "anticuerpo biespecífico" es un anticuerpo con especificidades de unión para dos epítomos diferentes. Un ejemplo de un anticuerpo biespecífico específicamente contemplado en el presente documento es la molécula Fab de doble acción HER3/EGFR (DAF), tal como DL11f comprende cadenas pesadas de IgG1 humana (documento US 2010/0255010; documento WO2010/108127).

Los anticuerpos del presente documento incluyen "variantes de secuencia de aminoácidos" con actividad biológica o

unión a antígeno alterada. Los ejemplos de dichas alteraciones de aminoácidos incluyen anticuerpos con afinidad potenciada por antígeno (por ejemplo, anticuerpos "madurados por afinidad") y anticuerpos con región Fc alterada, por ejemplo, con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo alterada (aumentada o disminuida) (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (véase, por ejemplo, el documento WO 00/42072, Presta, L. y el documento WO 99/51642, Iduosogie et al.); y/o una vida media en suero aumentada o disminuida (véase, por ejemplo, el documento WO00/42072, Presta, L.).

Una "variante de afinidad madurada" tiene uno o más restos de región hipervariable sustituida de un anticuerpo original (por ejemplo, de un anticuerpo parental quimérico, humanizado o humano) que mejora la unión de la variante de afinidad madurada.

El anticuerpo del presente documento puede conjugarse con una "molécula heteróloga", por ejemplo, para aumentar la vida media o la estabilidad del anticuerpo o mejorarlo de otro modo. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar unido a uno de diversos polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol.

El anticuerpo del presente documento puede ser una "variante de glucosilación" de manera que cualquier hidrato de carbono unido a su región Fc esté alterado. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de hidrato de carbono madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en la Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º US 2003/0157108 (Presta, L.). Véase también el documento US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina bisecante (GlcNAc) en el hidrato de carbono unida a una región Fc del anticuerpo se mencionan en el documento WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. y la Patente de los EE.UU. N.º 6.602.684, Umana et al. Los anticuerpos con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo se notifican en el documento WO 1997/30087, Patel et al. Véanse, también, el documento WO 1998/58964 (Raju, S.) y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.) relativos a anticuerpos con hidratos de carbono alterados unidos a la región Fc de los mismos. Véase también el documento US 2005/0123546 (Umana et al.) que describe anticuerpos con glicosilación modificada.

La expresión "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión del antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (por sus siglas en inglés) (por ejemplo, restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.º Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU., Bethesda, MD. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk J. *Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). Los restos de "región marco conservada" o "FR" (por sus siglas en inglés) son aquellos restos de dominio variable distintos de los restos de la región hipervariable como se define en el presente documento. Las CDR de rituximab, bevacizumab y trastuzumab se desvelan en las Figuras 8A-B, 9A-B y 10A-B, respectivamente.

Un "anticuerpo de longitud completa" es uno que comprende una región variable de unión a antígeno, así como un dominio constante de cadena ligera (CL) y dominios constantes de cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo de longitud completa tiene una o más funciones efectoras. En una realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226 o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, la numeración de restos de aminoácidos en la región Fc o región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, como se describe en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU., Bethesda, MD, 1991. Rituximab, trastuzumab y bevacizumab son ejemplos de anticuerpos de longitud completa.

Un "anticuerpo desnudo" es un anticuerpo monoclonal que no está conjugado con una molécula heteróloga, tal como un resto citotóxico, polímero o radiomarcador. Rituximab, trastuzumab y bevacizumab son ejemplos de anticuerpos desnudos.

Las "funciones efectoras" de anticuerpo se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc de la variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen la unión de C1q, la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la unión al receptor de Fc, la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC), etc.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, pueden asignarse anticuerpos de longitud completa los a diferentes clases. Existen cinco clases principales de anticuerpos de longitud completa: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de ellas pueden dividirse adicionalmente en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA y IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras

de subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. El anticuerpo en el presente documento es una IgG1 humana de acuerdo con una realización de la invención.

Un anticuerpo "IgG1 humana" en el presente documento se refiere a un anticuerpo de longitud completa que comprende dominios constantes de cadena pesada de IgG1 humana.

La expresión "anticuerpo recombinante" como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humano, humano o quimérico) que se expresa mediante una célula hospedadora recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo monoclonal. Los ejemplos de "células hospedadoras" para producir anticuerpos recombinantes incluyen: (1) células de mamífero, por ejemplo, ovario de hámster chino (CHO), COS, células de mieloma (incluyendo células Y0 y NS0), riñón de hámster bebé (BHK), Células Hela y Vero; (2) células de insecto, por ejemplo, sf9, sf21 y Tn5; (3) células vegetales, por ejemplo, plantas que pertenecen al género *Nicotiana* (por ejemplo, *Nicotiana tabacum*); (4) células de levadura, por ejemplo, las que pertenecen al género *Saccharomyces* (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) o el género *Aspergillus* (por ejemplo, *Aspergillus niger*); (5) células bacterianas, por ejemplo, células de *Escherichia coli* o células de *Bacillus subtilis*, etc.

Como se usa en el presente documento, "unirse específicamente" o "se une específicamente a" se refieren a un anticuerpo que se une de forma selectiva o preferencial a un antígeno. Preferentemente, la afinidad de unión por el antígeno es de un valor de Kd de 10^{-9} mol/l o inferior (por ejemplo, 10^{-10} mol/l), preferentemente con un valor de Kd de 10^{-10} mol/l o inferior (por ejemplo, 10^{-12} mol/l). La afinidad de unión se determina con un ensayo de unión convencional, tal como la técnica de resonancia de plasmón superficial (BIACORE®).

Un "anticuerpo monoclonal terapéutico" es un anticuerpo monoclonal utilizado para la terapia de un sujeto humano. Los anticuerpos monoclonales terapéuticos desvelados en el presente documento incluyen: anticuerpos CD20 para la terapia de tumores malignos de células B (tales como linfoma no Hodgkin o leucemia linfocítica crónica) o enfermedades autoinmunitarias (tales como artritis reumatoide y vasculitis); anticuerpos HER2 contra el cáncer (tal como cáncer de mama o cáncer gástrico); anticuerpos VEGF para el tratamiento del cáncer, la degeneración macular relacionada con la edad, el edema macular, etc.

Para los fines del presente documento, "rituximab" se refiere a un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos pesada variable en la SEQ ID No. 3 y los aminoácidos de la cadena ligera variable en la SEQ ID No. 4, y, opcionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada en la SEQ ID No. 1 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera en la SEQ ID No. 2. Este término incluye específicamente rituximab biosimilar.

Para los fines del presente documento, "bevacizumab" se refiere a un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos pesada variable en la SEQ ID No. 13 y los aminoácidos de la cadena ligera variable en la SEQ ID No. 14, y, opcionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada en la SEQ ID No. 11 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera en la SEQ ID No. 12. Este término incluye específicamente bevacizumab biosimilar.

Para los fines del presente documento, "trastuzumab" se refiere a un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos pesada variable en la SEQ ID No. 23 y los aminoácidos de la cadena ligera variable en la SEQ ID No. 24, y, opcionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada en la SEQ ID No. 21 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera en la SEQ ID No. 22. Este término incluye específicamente trastuzumab biosimilar.

El anticuerpo monoclonal que se formula en el presente documento es preferentemente esencialmente puro y deseablemente esencialmente homogéneo (es decir, libre de proteínas contaminantes, etc.). Un anticuerpo "esencialmente puro" significa una composición que comprende al menos aproximadamente el 90 % en peso del anticuerpo, basado en el peso total de la composición, preferentemente al menos aproximadamente el 95 % en peso. Anticuerpo "esencialmente homogéneo" significa una composición que comprende al menos aproximadamente el 99 % en peso de anticuerpo, basado en el peso total de la composición.

II. Anticuerpos monoclonales que se han de formular en el presente documento

A continuación, se describen técnicas de ejemplo para producir anticuerpos monoclonales que pueden formularse de acuerdo con la presente invención. En una realización, el antígeno al que se une el anticuerpo es una proteína biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece una enfermedad o trastorno puede dar como resultado un beneficio terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, también se contemplan anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos (tales como antígenos de glucolípidos asociados a tumores, véase la Patente de los EE.UU. 5.091.178).

Cuando el antígeno es un polipéptido, puede ser una molécula transmembrana (por ejemplo, un receptor) o un ligando tal como un factor de crecimiento. Los antígenos ilustrativos incluyen moléculas tales como renina; una hormona del crecimiento, incluyendo la hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina; factor de liberación de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante de la tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimuladora folicular;

calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como factor VIIIc, factor IX, factor tisular (TF) y factor de von Willebrand; factores anticoagulantes tales como Proteína C; péptido natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador de plasminógeno, tal como uroquinasa u orina humana o activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (regulado en la activación normalmente de linfocito T expresado y secretado); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); una albúmina sérica tal como albúmina sérica humana; sustancia inhibidora muelleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; DNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como el factor neurotrófico derivado de los huesos (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6) o un factor de crecimiento nervioso tal como NGF-b; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-b1, TGF-b2, TGF-b3, TGF-b4 o TGF-b5; un factor de necrosis tumoral (TNF) tal como TNF-alfa o TNF-beta; factor de crecimiento similar a la insulina I y II (IGF-I e IGF-II); des(I-3)-IGF-I (IGF-I del cerebro), proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22 y CD40; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón-alfa, -beta y -gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9 e IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana superficiales; factor de aceleración de la desintegración; antígeno vírico tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del SIDA; proteínas de transporte; receptores de migración; adreínas; proteínas reguladoras; integrinas tales como CD11a, CD11b, CD11e, CD18, un ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor tal como receptor HER2, HER3 o HER4; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente.

Las dianas moleculares de ejemplo para anticuerpos abarcadas por formulación de la presente invención incluyen proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD34 y CD40; miembros de la familia de receptores ErbB tales como el receptor de EGF, el receptor HER2, HER3 o HER4; antígenos de superficie de células B, tales como CD20 o BR3; un miembro de la superfamilia del receptor de necrosis tumoral, incluyendo DR5; antígeno prostático de células madre (PSCA); moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, MacI, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, integrina alfa4/beta7 e integrina alfa5/beta3 incluyendo ya sea subunidades alfa o beta de las mismas (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento tales como VEGF así como también receptores para los mismos; factor tisular (TF); un factor de necrosis tumoral (TNF) tal como TNF-alfa o TNF-beta, interferón alfa (alfa-IFN); una interleucina, tal como IL-8; IgE; antígenos del grupo sanguíneo; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor mpl; CTLA-4; proteína C, etc.

Los antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados con otras moléculas, pueden usarse como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembrana, tales como receptores, pueden usarse fragmentos de estos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) como inmunógeno. Como alternativa, pueden usarse células que expresan la molécula transmembrana como inmunógeno. Dichas células pueden derivar de una fuente natural (por ejemplo, estirpes celulares cancerosas) o pueden ser células que se han transformado mediante técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembrana. Otros antígenos y formas de los mismos útiles para preparar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la materia.

Los ejemplos de anticuerpos que pueden formularse de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: anticuerpos anti-ErbB, incluyendo anticuerpos anti-HER2 (por ejemplo, trastuzumab o pertuzumab); anticuerpos que se unen a un marcador de superficie de células B, tal como CD20 (por ejemplo, rituximab y 2H7/ocrelizumab humanizado), CD22, CD40 o BR3; anticuerpos que se unen a IgE, incluyendo omalizumab (XOLAIR®) disponible en el mercado de Genentech, E26, HAE1, anticuerpo IgE con una sustitución de aminoácido en la posición 265 de una región Fc del mismo (documento US 2004/0191244 A1), Hu-901, un anticuerpo IgE como en el documento W02004/070011 o anticuerpo que se une al segmento extracelular pequeño en IgE, M1' (por ejemplo, 47H4v5; véase la Patente de los EE.UU. N.º 8.071.097), véase, también, Presta *et al.*, *J. Immunol.* 151: 2623-2632 (1993); la Publicación Internacional N.º WO 95/19181; la Patente de los EE.UU. N.º 5.714.338, expedida el 3 de febrero de 1998; la Patente de los EE.UU. N.º 5.091.313, expedida el 25 de febrero de 1992; el documento WO 93/04173 publicado el 4 de marzo de 1993; el documento WO 99/01556 publicado el 14 de enero de 1999; y la Patente de los EE.UU. N.º 5.714.338; anticuerpos que se unen al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (por ejemplo, bevacizumab) o un receptor de VEGF; anticuerpos anti-IL-8 (St John *et al.*, *Chest*, 103: 932 (1993) y la Publicación Internacional N.º WO 95/23865); anticuerpos anti-PSCA (documento WO01/40309); anticuerpos anti-CD40, incluyendo S2C6 y variantes humanizadas de los mismos (documento WO00/75348); anticuerpos anti-CD11a, incluyendo efalizumab (RAPTIVA®) (Patente de los EE.UU. N.º 5.622.700, WO 98/23761, Steppe *et al.*, *Transplant Intl.* 4: 3-7 (1991) y Hourmant *et al.*, *Transplantation* 58: 377-380 (1994)); anticuerpos anti-CD18 (Patente de los EE.UU. N.º 5.622.700, expedida el 22 de abril de 1997 o como en el documento WO 97/26912, publicado el 31 de julio de 1997); anticuerpo anti-receptor Apo-2 (documento WO 98/51793 publicado el 19 de noviembre de 1998); anticuerpos anti-TNF-alfa incluyendo cA2 (REMICADE®) y adalimumab (HUMIRA®), CDP571 y MAK-195 (Afelimomab) (véase, la Patente de los EE.UU. N.º 5.672.347 expedida el 30 de septiembre de

- 1997, Lorenz *et al.*, *J. Immunol.* 156 (4): 1646-1653 (1996) y Dhainaut *et al.*, *Crit. Care Med.* 23 (9): 1461-1469 (1995)); factor anti-tejido (TF) (Patente Europea N.º 0 420 937 B1 concedida el 9 de noviembre de 1994); integrina $\alpha 4\beta 7$ anti-humana (documento WO 98/06248 publicado el 19 de febrero de 1998); anticuerpos anti-EGFR, incluyendo anticuerpo 225 quimerizado o humanizado como en el documento WO 96/40210 publicado el 19 de diciembre de 1996; anticuerpos anti-CD3, tales como OKT3 (Patente de los EE.UU. N.º 4.515.893 expedida el 7 de mayo de 1985); anticuerpos anti-CD25 o anti-tac tales como CHI-621 (SIMULECT®) y (ZENAPAX®) (Véase la Patente de los EE.UU. N.º 5.693.762, expedida el 2 de diciembre de 1997); anticuerpos anti-CD4 tales como el anticuerpo cM-7412 (Choy *et al.*, *Arthritis Rheum* 39(1): 52-56 (1996)); anticuerpos anti-CD52 tales como alemtuzumab (CAMPATH-1H®) (Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-337 (1988); anticuerpos del receptor anti-Fc tales como el anticuerpo M22 dirigido contra Fc γ RI como en Graziano *et al.*, *J. Immunol.* 155 (10): 4996-5002 (1995); antígeno anti-carcinoembrionario (CEA) anticuerpos tales como hMN-14 (Sharkey *et al* *Cancer Res.* 55 (Supl. 23): 5935s-5945s (1995); anticuerpos dirigidos contra células epiteliales de mama incluyendo huBrE-3, hu-Mc3 y CHL6 (Ceriani *et al.*, *Cancer Res.* 55 (23): 5852s-5856s (1995) y Richman *et al.* *Cancer Res.* 55 (Supl. 23): 5916s-5920s (1995)), anticuerpos que se unen a células de carcinoma de colon tales como C242 (Litton *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 26 (1): 1-9 (1996)); anticuerpos anti-CD38, por ejemplo, AT 13/5 (Ellis *et al.* *J. Immunol.* 155 (2): 925-937 (1995)), anticuerpos anti-CD33 tales como Hu M195 (Jurcic *et al.*, *Cancer Res* 55 (Supl. 23): 5908s-5910s (1995) y CMA-676 o CDP771; anticuerpos anti-CD22 tales como LL2 o LymphoCide (Juweid *et al.*, *Cancer Res* 55 (Supl. 23): 5899s-5907s (1995); anticuerpos anti-EpCAM tales como 17-1A (PANOREX®); anticuerpos anti-GpIIb/IIIa tales como abciximab o c7E3 Fab (REOPRO®); anticuerpos anti-RSV tales como MEDI-493 (SYNAGIS®); anticuerpos anti-CMV tales como PROTOVIR®; anticuerpos anti-VIH tales como PRO542; anticuerpos anti-hepatitis tales como el anticuerpo anti-Hep B OSTAVIR®; anticuerpo anti-CA 125 OvaRex; anticuerpo BEC2 de epítipo GD3 antiidiotípico; anticuerpo anti- $\alpha v\beta 3$ VITAXIN®; anticuerpo anti-carcinoma de células renales humano tal como ch-G250; ING-1; anticuerpo 17-1A antihumano (3622W94); anticuerpo tumoral colorrectal antihumano (A33); anticuerpo de melanoma antihumano R24 dirigido contra gangliósido GD3; carcinoma de células escamosas antihumano (SF-25); y anticuerpos anti-antígeno leucocitario humano (HLA) tales como Smart ID10 y el anticuerpo DR anti-HLA Oncolym (Lym-1); anti-CCR5 (PRO 140); ABT-325; ABT-308; ABT-147; anti-beta7 (etrolizumab); DAF anti-HER3/EGFR (DL11f); receptor anti-interleucina 6 (IL6R) tal como tocilizumab (ACTEMRA®); y anti-Abeta (véase el documento WO2003/070760 y el documento WO2008/011348), etc.
- En una realización, el anticuerpo que se formula en el presente documento se une a CD20 y se selecciona entre: rituximab, ocrelizumab/2H7 humanizado (Genentech), ofatumumab (documento WO 04/035607, Genmab, Dinamarca), 1F5 parcheado de región marco conservada/humanizado (documento WO03/002607, Leung, S.), AME-133 (Evolución Molecular Aplicada) y anticuerpo A20 humanizado (documento US 2003/0219433, Immunomedics).
- En una realización, el anticuerpo que se formula se une a HER2 y es trastuzumab o pertuzumab.
- En una realización, el anticuerpo que se formula se une a VEGF y es bevacizumab.
- En una realización, el anticuerpo que se formula en el presente documento es un anticuerpo humanizado.
- En una realización, el anticuerpo que se formula es un anticuerpo recombinante.
- En una realización, el anticuerpo que se formula ha sido expresado por una célula recombinante de ovario de hámster chino (CHO).
- En una realización, el anticuerpo que se formula es un anticuerpo de longitud completa.
- En una realización, el anticuerpo que se formula es un anticuerpo IgG1 humano de longitud completa.
- En una realización, el anticuerpo que se formula es un anticuerpo IgG1 humanizado de longitud completa.
- En una realización, el anticuerpo que se formula es un anticuerpo IgG1 humanizado recombinante de longitud completa.
- En una realización, el anticuerpo que se formula es un anticuerpo IgG1 humanizado de longitud completa que ha sido expresado por una célula recombinante de ovario de hámster chino (CHO).
- En una realización, el anticuerpo que se formula se une a un antígeno seleccionado entre: CD20 (por ejemplo, rituximab), HER2 (por ejemplo, trastuzumab), VEGF (bevacizumab), IL6R (tocilizumab), beta7 (etrolizumab), Abeta, HER3 y EGFR (DL11f) y M1' (47H4v5).
- En una realización, el anticuerpo formulado es rituximab.
- En una realización, el anticuerpo formulado es trastuzumab.
- En una realización, el anticuerpo formulado es bevacizumab.

III. La preparación secada previamente por pulverización

Generalmente se prepara una preparación del anticuerpo monoclonal que se va a someter a secado por pulverización, la denominada "preparación secada previamente por pulverización" del presente documento.

En una realización, la preparación secada previamente por pulverización comprende una preparación de anticuerpo monoclonal que se ha sometido a una o más etapas de purificación anteriores, tales como cromatografía de afinidad (por ejemplo, cromatografía de proteína A), cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de intercambio iónico (cromatografía de intercambio aniónico y/o catiónico), filtración de virus, etc. Por tanto, la preparación de anticuerpo puede purificarse, ser esencialmente pura y/o esencialmente homogénea.

En una realización, el anticuerpo monoclonal en la preparación secada previamente por pulverización se concentra. Los métodos de ejemplo para concentrar el anticuerpo incluyen filtración (tal como filtración de flujo tangencial o ultrafiltración), diálisis, etc.

La preparación secada previamente por pulverización puede ser líquida o congelada.

El pH de la preparación secada previamente por pulverización se ajusta opcionalmente mediante un tampón. El tampón puede, por ejemplo, tener un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, por ejemplo, de aproximadamente 5 a 7, por ejemplo, de 5,8 a 6,2, y, en una realización, es de aproximadamente 6,0. Un tampón de histidina es una realización ejemplificada en el presente documento. La concentración del tampón está dictada, al menos en parte, por el pH deseado. Las concentraciones de ejemplo para el tampón son de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 200 mM o de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 40 mM.

La preparación secada previamente por pulverización también comprende opcionalmente uno o más estabilizadores que evitan la desnaturalización y/o la agregación del anticuerpo durante el proceso de secado por pulverización. Los ejemplos de dichos estabilizadores incluyen sacáridos (por ejemplo, sacarosa o trehalosa) y/o tensioactivos (por ejemplo, polisorbato 20 o polisorbato 80) y/o aminoácidos (por ejemplo, histidina, arginina, glicina y/o alanina). Los estabilizadores generalmente se añaden en cantidades que protegen y/o estabilizan el anticuerpo monoclonal en la cantidad más baja de estabilizador posible, para evitar el aumento de la viscosidad de la formulación final.

Con respecto a los estabilizadores de sacáridos, tales como los disacáridos (por ejemplo, trehalosa o sacarosa), la relación molar de sacárido:anticuerpo monoclonal (o disacárido:anticuerpo monoclonal) es opcionalmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 400:1, por ejemplo, de aproximadamente 100 a aproximadamente 250:1. Expresado de manera diferente, las concentraciones de ejemplo de sacáridos en la preparación previamente secada por pulverización son, por ejemplo, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 1 M, por ejemplo, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM.

Con respecto al tensioactivo (si se incluye en la formulación secada previamente por pulverización), polisorbato 20 o polisorbato 80 son ejemplos de tensioactivos que pueden incluirse. El tensioactivo generalmente se incluye en una cantidad que reduce o evita la desnaturalización y/o agregación del anticuerpo monoclonal durante el proceso de secado por pulverización. La concentración de tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20 o polisorbato 80) es opcionalmente de aproximadamente el 0,0001 % a aproximadamente el 1,0 %, por ejemplo, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,1 %.

La preparación secada previamente por pulverización puede someterse a procedimientos de secado por pulverización tales como los que se describen en la siguiente sección.

IV. Secado por pulverización de la preparación

El secado por pulverización en el presente documento es distinto del secado por congelación habitualmente utilizado para preparar formulaciones de anticuerpos monoclonales en la medida en que se realiza a temperaturas superiores a la temperatura ambiente. Las temperaturas de secado por pulverización se expresan habitualmente como temperaturas de "entrada de aire" y "salida de aire". En una realización, el secado por pulverización se realiza a una temperatura de entrada de aire de aproximadamente 100 °C a aproximadamente 220 °C (por ejemplo, de aproximadamente 120 °C a aproximadamente 160 °C) y una temperatura de salida de aire de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 100 °C (por ejemplo, de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 80 °C).

El proceso de secado por pulverización generalmente comprende: atomización de la alimentación de líquido; secado de las gotitas; y separación o recuperación del producto seco.

Las realizaciones de los atomizadores en el presente documento incluyen: atomizadores giratorios, atomizadores de boquilla neumática, atomizadores de boquillas ultrasónicas, boquillas sónicas, etc.

El contacto entre la alimentación de líquido y el aire de secado puede producirse de dos modos diferentes. En un sistema de corrientes paralelas, el aire de secado y las partículas (gotitas) se mueven a través de la cámara de

secado en la misma dirección. Cuando se secan el aire y las gotitas se mueven en una dirección opuesta, esto se denomina modo a contracorriente. Las partículas producidas en el modo a contracorriente generalmente muestran una temperatura más alta que el aire que se expulsa. El aire expulsado puede salir del sistema o puede recircularse. Escogiendo entre los diferentes diseños de secador por pulverización (tamaño, atomizador, condiciones asépticas, etc.) y ajustando los diferentes parámetros del proceso (flujo del aire de secado, temperatura del aire de secado, etc.), las propiedades finales del polvo como el tamaño de partícula, la forma y estructura o incluso la esterilidad pueden modificarse. Si la humedad resultante del polvo recuperado no es suficientemente baja, podría ser necesario un tratamiento posterior, por ejemplo, en forma de secadores y enfriadores de lecho fluido, secadores de contacto o incluso secadores de microondas.

Cuando se atomiza el líquido de alimentación, aumenta su relación de superficie a masa, la transferencia de calor entre el aire y las gotitas se acelera y las gotitas pueden secarse con relativa rapidez. Pueden estar implicados dos procesos de convección: transferencia de calor (aire a gotita) y transferencia de humedad en masa (gotita a aire). En esta última, la humedad penetra a través de la capa límite que rodea cada gotita. Las tasas de transferencia pueden estar influenciadas por la temperatura, la humedad, las propiedades de transporte del aire circundante, el diámetro de la gotita y la velocidad relativa entre la gotita y el aire.

La última etapa de un proceso de secado por pulverización es normalmente la separación del polvo del aire/gas y la retirada del producto secado. En algunas realizaciones, esta etapa es tan eficaz como sea posible para obtener altos rendimientos de polvo y para evitar la contaminación del aire a través de la emisión de polvo a la atmósfera. Para este fin, hay disponibles diversos métodos tales como ciclones, filtros de bolsa, precipitadores electrostáticos, gas a alta presión, carga electrostática y combinaciones de los mismos.

El proceso de secado por pulverización produce partículas que comprenden el anticuerpo monoclonal.

En una realización, las características del polvo secado por pulverización comprenden uno cualquiera o más de los siguientes:

- (a) tamaño de partícula promedio: de aproximadamente 2 micrómetros a aproximadamente 30 micrómetros; por ejemplo, de aproximadamente 2 micrómetros a aproximadamente 10 micrómetros;
- (b) morfología de partículas: partículas predominantemente esféricas, algunos hoyuelos o agujeros en las partículas, forma de "pasas secas";
- (c) contenido de agua: menos de aproximadamente el 10 %, por ejemplo, menos de aproximadamente el 5 %, por ejemplo, donde el contenido de agua se mide mediante un método de titulación química (por ejemplo, método de Karl Fischer) o un método de pérdida de peso (calentamiento a alta temperatura); y
- (d) estabilidad: por ejemplo, evaluada mediante la suspensión de las partículas en un vehículo y la evaluación de la estabilidad física y/o la estabilidad química y/o la actividad biológica de la preparación de suspensión. En una realización, el porcentaje de monómero de dicha preparación es del 95 % al 100 %, por ejemplo, según se evalúa mediante cromatografía de exclusión por tamaño (CET).

V. La formulación de suspensión

Las partículas de anticuerpo monoclonal secadas por pulverización preparadas como se describe en la sección anterior se combinan con un vehículo de suspensión no acuoso para generar la formulación de suspensión. Esta formulación es adecuada para la administración a un sujeto. En general, la formulación de suspensión no se someterá a liofilización ni cristalización previa o posterior. En una realización, un dispositivo de administración subcutánea (por ejemplo, una jeringa precargada) se carga con la formulación de suspensión y se usa para administrar la formulación (véase a continuación una divulgación más detallada con respecto a los dispositivos y métodos de tratamiento).

La invención también proporciona un método de fabricación de una formulación de suspensión que comprende suspender el anticuerpo monoclonal secado por pulverización en un vehículo de suspensión no acuoso.

En una realización, la concentración de anticuerpo en la formulación de suspensión es de aproximadamente 200 mg/ml o más.

En una realización, la concentración de anticuerpo en la formulación de suspensión es de aproximadamente 200 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml.

La concentración de anticuerpo en la formulación de suspensión puede ser de aproximadamente 250 mg/ml a aproximadamente 400 mg/ml.

La concentración de anticuerpo en la formulación de suspensión puede ser de aproximadamente 250 mg/ml a aproximadamente 350 mg/ml.

El vehículo de suspensión no acuoso tiene preferentemente una viscosidad a 25 °C, que es inferior a

aproximadamente 20 centipoise, por ejemplo, inferior a aproximadamente 10 centipoise y, opcionalmente, inferior a aproximadamente 5 centipoise.

La viscosidad de la formulación de suspensión puede ser de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 centipoise, por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 70 centipoise a 25 °C. En una realización, la viscosidad de la formulación de suspensión se mide usando un reómetro de cono y placa (por ejemplo, un reómetro AR-G2 TA Instrument).

En una realización, el tamaño promedio de partícula en la formulación de suspensión es de aproximadamente 2 micrómetros a aproximadamente 30 micrómetros, por ejemplo, de aproximadamente 5 micrómetros a aproximadamente 10 micrómetros.

En una realización, la formulación de suspensión tiene una fuerza de deslizamiento de la inyección inferior a aproximadamente 20 Newton, por ejemplo, inferior a aproximadamente 15 Newton. Dicha fuerza de deslizamiento de inyección puede determinarse como una función de la concentración de anticuerpos monoclonales mediante la inyección de una suspensión de 1 ml usando una jeringa de 1 ml de longitud a través de una aguja fija TW de calibre 27 en 10 segundos.

El vehículo de suspensión no acuoso puede seleccionarse entre: dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, benzoato de bencilo, lactato de etilo o mezclas de dos o tres de los mismos.

De acuerdo con la invención, el vehículo de suspensión no acuoso comprende lactato de etilo.

El vehículo de suspensión no acuoso puede comprender una mezcla de al menos dos vehículos de suspensión no acuosos: Vehículo A más vehículo B, en los que la viscosidad del vehículo A es inferior a la del vehículo B, pero la estabilidad del anticuerpo monoclonal en el Vehículo B es superior a la del Vehículo A. Una realización de dicha mezcla se ejemplifica mediante la mezcla de lactato de etilo y dicaprilato/dicaprato de propilenglicol (por ejemplo).

En un aspecto, la formulación de suspensión comprende un anticuerpo monoclonal IgG1 humano de longitud completa secado por pulverización a una concentración de aproximadamente 200 mg/ml a aproximadamente 400 mg/ml suspendido en un vehículo de suspensión no acuoso con una viscosidad inferior a aproximadamente 20 centipoise, en la que la formulación tiene un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 2 micrómetros a aproximadamente 10 micrómetros y una fuerza de deslizamiento de la inyección inferior a aproximadamente 15 Newton.

La formulación de suspensión comprende opcionalmente además uno o más excipientes o estabilizadores. Los ejemplos de dichos estabilizadores incluyen sacáridos (por ejemplo, sacarosa o trehalosa) y/o tensioactivos (por ejemplo, polisorbato 20 o polisorbato 80) y/o aminoácidos (por ejemplo, histidina, arginina, glicina y/o alanina). Los estabilizadores están generalmente presentes en una cantidad que protege y/o estabiliza el anticuerpo monoclonal en la cantidad más baja de estabilizador posible, para evitar el aumento de la viscosidad de la formulación de suspensión. En una realización, los estabilizadores están presentes en la formulación de suspensión como resultado de haberse añadido a la preparación previamente secada por pulverización y/o haberse añadido a la formulación de suspensión, según se desee.

Con respecto a estabilizadores de sacáridos, tales como disacáridos (por ejemplo, trehalosa o sacarosa), la relación molar de sacárido:anticuerpo monoclonal (o disacárido:anticuerpo monoclonal) en la formulación de suspensión es opcionalmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 400:1, por ejemplo, de aproximadamente 100 a aproximadamente 250:1. Dicho de forma diferente, las concentraciones de ejemplo de sacárido en la formulación de suspensión son de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 1 M, por ejemplo, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM.

Con respecto al tensioactivo (si se incluye en la preparación secada previamente por pulverización), el polisorbato 20 o el polisorbato 80 son ejemplos de tensioactivos que pueden estar presentes en la formulación de suspensión. La concentración de tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20 o polisorbato 80) es opcionalmente de aproximadamente el 0,0001 % a aproximadamente el 1,0 %, por ejemplo, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,1 %.

La formulación de suspensión generalmente es estéril y esto puede conseguirse de acuerdo con los procedimientos conocidos por el experto en la materia para generar formulaciones farmacéuticas estériles adecuadas para la administración a sujetos humanos, incluyendo la filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la preparación de la formulación de suspensión.

Además, la formulación es deseablemente una que se ha demostrado que es estable durante el almacenamiento. Hay disponibles diversos ensayos de estabilidad para el experto en la materia para confirmar la estabilidad de la formulación. La estabilidad puede someterse a ensayo mediante la evaluación de la estabilidad física, la estabilidad química y/o la actividad biológica del anticuerpo en la formulación de suspensión en el momento de la formulación,

así como después del almacenamiento a diferentes temperaturas y puntos temporales. En una realización, la estabilidad del anticuerpo monoclonal se evalúa mediante distribución de tamaño (porcentaje de monómero, agregación y/o fragmentación) antes y después del secado por pulverización (por ejemplo, antes y después del secado por pulverización durante 3 meses de almacenamiento a la temperatura acelerada de 40 °C). En una

5 realización, la distribución del tamaño se evalúa mediante el uso de cromatografía líquida de exclusión por tamaño-cromatografía de alta resolución (CET-HPLC). En una realización, el porcentaje de pérdida de monómero en la formulación de suspensión (medido por CET-HPLC) durante 3 meses es inferior a aproximadamente el 10 %, por ejemplo, inferior a aproximadamente el 5 %.

10 En una realización, la divulgación proporciona un método de fabricación de una formulación farmacéutica que comprende preparar la formulación de suspensión como se describe en el presente documento y evaluar una o más de las siguientes propiedades de la formulación:

15 (a) estabilidad física, estabilidad química y/o actividad biológica del anticuerpo monoclonal en la suspensión (por ejemplo, medición del porcentaje de monómero usando cromatografía de exclusión por tamaño);
 (b) viscosidad de la formulación de suspensión;
 (c) inyectabilidad o fuerza de deslizamiento de inyección de la formulación de suspensión;
 (d) análisis de energía superficial (AES) o calor de sorción, por ejemplo, mediante cromatografía de gases inversa (CGI) para evaluar la interacción partícula-vehículo de suspensión;
 20 (e) tamaño de partícula (por ejemplo, tamaño de partícula promedio y/o pico, por ejemplo, mediante un analizador de difracción láser); y/o
 (e) estabilidad física de la suspensión (sedimentación, homogeneidad en el tiempo, tasa de sedimentación de partículas, etc.).

25 Se proporcionan detalles adicionales de ensayos de ejemplo para estas propiedades se proporcionan en el ejemplo a continuación.

Pueden incluirse uno o más vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables adicionales tales como los que se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980) en la

30 formulación a condición de que no afecten adversamente a las características deseadas de la formulación. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son atóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas e incluyen; agentes tamponantes adicionales; cosolventes; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos metálicos (por ejemplo, Zn-proteína); polímeros biodegradables tales como poliésteres; conservantes; y/o contraiones formadores de sal tales como sodio.

35 VI. Medicamentos y tratamientos usando la formulación de suspensión

En una realización, la invención proporciona una formulación que se describe en el presente documento para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto que comprende administrar la formulación

40 de suspensión que se describe en el presente documento a un sujeto en una cantidad eficaz para el tratamiento de la enfermedad o trastorno.

Por tanto, la invención proporciona: la formulación de suspensión como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de un paciente que necesita tratamiento con el anticuerpo monoclonal en la formulación de

45 suspensión; y el uso de la formulación de suspensión en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que necesita tratamiento con el anticuerpo monoclonal en la formulación de suspensión. En una realización alternativa, la invención proporciona: la formulación como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un paciente; y el uso de la formulación en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un paciente.

50 Además, la invención proporciona una formulación que se describe en el presente documento para su uso en un método para el tratamiento de un paciente que comprende administrar la formulación que se describe en el presente documento a un paciente para el tratamiento de una enfermedad o trastorno en el sujeto. Preferentemente, la formulación se administra por vía subcutánea al sujeto o paciente. En una realización, la formulación se administra

55 mediante una jeringa precargada que contiene la formulación en la misma.

Cuando el anticuerpo en la formulación se une a HER2, la formulación de suspensión se usa preferentemente para el tratamiento del cáncer. El cáncer comprenderá generalmente células que expresan HER2, de manera que el anticuerpo HER2 del presente documento puede unirse a las células cancerosas. Por tanto, la invención en esta

60 realización se refiere a un método para el tratamiento del cáncer que expresa HER2 en un sujeto, que comprende administrar la formulación farmacéutica de anticuerpo HER2 al sujeto en una cantidad eficaz para el tratamiento del cáncer. Son cánceres de ejemplo que se tratan en el presente documento con un anticuerpo contra HER2 (por ejemplo, trastuzumab o pertuzumab) el cáncer de mama o el cáncer gástrico positivos para HER2.

65 Cuando el anticuerpo en la formulación se une a un marcador de superficie de células B tal como CD20, la formulación puede usarse para el tratamiento de una malignidad de células B, tal como LNH o LLC o una

enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, artritis reumatoide o vasculitis).

Cuando el anticuerpo en la formulación se une a VEGF (por ejemplo, bevacizumab), la formulación puede usarse para inhibir la angiogénesis, tratar el cáncer (tal como el cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), glioblastoma, cáncer de mama y carcinoma de células renales) o para tratar la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) o el edema macular.

Cuando la indicación es cáncer, el paciente puede tratarse con una combinación de la formulación de suspensión y un agente quimioterápico. La administración combinada incluye la coadministración o administración simultánea, usando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica única y la administración consecutiva en cualquier orden, en la que existe un período de tiempo cuando ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Por tanto, el agente quimioterápico puede administrarse antes o después de la administración de la composición. En esta realización, el tiempo entre al menos una administración del agente quimioterápico y al menos una administración de la formulación es preferentemente de aproximadamente 1 mes o menos y mucho más preferentemente de aproximadamente 2 semanas o menos. Como alternativa, el agente quimioterápico y la formulación se administran simultáneamente al paciente, en una única formulación o formulaciones separadas.

El tratamiento con la formulación de suspensión dará como resultado una mejora en los signos o síntomas de la enfermedad o trastorno. Además, el tratamiento con la combinación del agente quimioterápico y la formulación del anticuerpo puede dar como resultado un beneficio terapéutico para el paciente sinérgico o mayor que el aditivo.

La formulación se administra a un paciente humano de acuerdo con métodos conocidos, tales como la administración intravenosa, por ejemplo, en bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, mediante administración intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasínovial o intratecal.

Se prefiere la administración intramuscular o subcutánea de la composición de anticuerpo, siendo la administración subcutánea la más preferida.

Para la entrega subcutánea, la formulación puede administrarse mediante una jeringa (por ejemplo, jeringa precargada); autoinyector; dispositivo de inyección (por ejemplo, dispositivo INJECT-EASE™ y GENJECT™); bolígrafo inyector (tal como GENPEN™); u otro dispositivo adecuado para la administración de una formulación de suspensión por vía subcutánea. El dispositivo preferido en el presente documento es una jeringa precargada.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada del anticuerpo monoclonal dependerá del tipo de enfermedad que se trata, como se ha definido anteriormente, la gravedad y el curso de la enfermedad, si el anticuerpo monoclonal se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo monoclonal y el criterio del médico tratante. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 µg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de anticuerpo es una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o por infusión continua. La dosificación del anticuerpo generalmente será de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Si se administra un agente quimioterápico, por lo general se administra en las dosis conocidas para el mismo, u opcionalmente reducidas debido a la acción combinada de los fármacos o los efectos secundarios negativos atribuibles a la administración del agente quimioterápico. Las pautas de preparación y dosificación para dichos agentes quimioterápicos pueden usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante o según determine empíricamente el experto en la materia. Las pautas de preparación y dosificación para dicha quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

VII. Artículos de fabricación

La invención del presente documento también se refiere a un dispositivo con la formulación de suspensión dentro del mismo. Preferentemente, el dispositivo es un dispositivo de administración subcutánea, tal como una jeringa precargada.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método de fabricación de un artículo de fabricación que comprende cargar un recipiente con la formulación de suspensión.

Las realizaciones del recipiente en el artículo de fabricación incluyen: jeringas (tales como una jeringa precargada), autoinyectores, frascos, viales (por ejemplo, viales de doble cámara) y tubos de ensayo, etc. El recipiente contiene la formulación de suspensión y la etiqueta sobre o asociada al contenedor puede indicar las instrucciones de uso. El artículo de fabricación puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tapones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e insertos de paquetes con instrucciones de uso como se indica en la sección anterior.

La invención se entenderá más completamente por referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

El desarrollo de formulaciones líquidas de anticuerpos monoclonales de alta concentración (≥ 200 mg/ml) para la administración subcutánea (SC) es con frecuencia un desafío con una viscosidad aumentada que dificulta la inyección. Esta investigación tiene por objeto superar este obstáculo usando un enfoque de suspensión en polvo no acuosa. Se secaron por pulverización tres anticuerpos monoclonales IgG1 humanos y se suspendieron en un vehículo de suspensión a diferentes concentraciones de anticuerpos monoclonales. Se emplearon dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, benzoato de bencilo y lactato de etilo como vehículos de suspensión modelo. Las suspensiones se caracterizaron por su viscosidad, tamaño de partícula y capacidad de inyección. La estabilidad física de la suspensión se inspeccionó visualmente. Las suspensiones en general superaron a las soluciones líquidas en términos de inyectabilidad a pesar de una mayor viscosidad a las mismas concentraciones de anticuerpos monoclonales. Las formulaciones en polvo y las propiedades del polvo parecían tener poco efecto sobre la viscosidad de la suspensión o la inyectabilidad. Entre los tres vehículos de suspensión, las suspensiones de lactato de etilo tuvieron la viscosidad más baja, inferior a 20 centipoise y la menor fuerza de deslizamiento de inyección por jeringa, inferior a 15 Newton, a una concentración de anticuerpos monoclonales tan alta como de 333 mg/ml (concentración total de polvo a 500 mg/ml). El análisis de cromatografía de gases inversa (CIG) de la suspensión respaldaba la conclusión de que el vehículo de suspensión era el factor más importante que afectaba al rendimiento de la suspensión. El lactato de etilo produjo un mayor calor de sorción que otros vehículos de suspensión. Sin quedar ligados a teoría alguna, esto indica que la fuerte interacción partícula-vehículo de suspensión puede reducir la autoasociación partícula-partícula, conduciendo a una viscosidad de la suspensión y a una fuerza de deslizamiento bajas. Sin embargo, las suspensiones de lactato de etilo carecían de la estabilidad de suspensión física presentada por dicaprilato/dicaprato de propilenglicol y benzoato de bencilo. Las mezclas específicas de lactato de etilo y dicaprilato/dicaprato de propilenglicol mejoraron el rendimiento de la suspensión global en suspensiones de alta concentración de anticuerpos monoclonales.

Entre otras cosas, estos ejemplos demostraron la viabilidad de una alta concentración de anticuerpos monoclonales (> 300 mg/ml) en formulaciones de suspensión para la administración SC.

Materiales y métodos

Se fabricaron tres anticuerpos monoclonales recombinantes quiméricos/humanizados de la subclase IgG1 humana bevacizumab, trastuzumab y rituximab por Genentech (Sur de San Francisco, CA). Estos anticuerpos fueron expresados por estirpes celulares de ovario de hámster chino (CHO). Todas las soluciones líquidas de sustancia de fármaco de anticuerpo se concentraron a 100 mg/ml usando una unidad de filtración de flujo tangencial (PELLICON3® 10 kD, Millipore, Billerica, MA) y se formularon con dihidrato de trehalosa. Todos los materiales a granel se tamponaron a un pH de $\sim 6,0$. Para la preparación de la suspensión de polvo de anticuerpos se usaron dicaprilato/dicaprato de propilenglicol (Lote n.º 091125, SASOL, Hamburgo, Alemania), benzoato de bencilo (Cat n.º B9550, Sigma-Aldrich, San Luis, MO) y lactato de etilo (Lote n.º BCBC7752, Sigma-Aldrich, San Luis, MO) como vehículos de suspensión.

Secado por pulverización

Se usaron dos tipos de secadores por pulverización en el presente estudio, una unidad a escala piloto (MS-35, SPX Flow Technology Systems, Inc., Elkridge, MD) y una unidad a escala experimental (B-191, Buchi Corp., New Castle, DE). MS-35 es aproximadamente 2 veces más grande que B-191, es decir, 2,5 frente a 1,6 kg/hora de la tasa máxima de evaporación de agua y 35 frente a 20 kg/hora de tasa máxima de consumo de aire comprimido. La unidad a escala piloto se construyó principalmente de acero inoxidable con aislamiento térmico (cámara de secado, ciclón, etc.) mientras que la unidad a escala experimental estaba hecha de vidrio. La unidad a escala piloto estaba equipada con un ciclón de alta eficiencia. Para calcular el rendimiento de la recolección de polvo, solo se tuvo en cuenta el polvo recogido en el receptor para la unidad a escala piloto y se incluyeron el polvo recogido en el ciclón y la tapa del receptor para la unidad a escala experimental. Las condiciones de secado por dispersión y los polvos secos característicos producidos usando ambos secadores por pulverización se enumeran en la Tabla 2.

Tabla 2: Condiciones de secado por pulverización en dos tipos de secadores por pulverización y resultados de caracterización de tres anticuerpos formulados con trehalosa a una relación de peso anticuerpo:trehalosa de 1:2

Tipo de anticuerpo monoclonal		Bevacizumab		Trastuzumab		Rituximab	
Condición de secado	Secador por pulverización	Piloto	Experi- mental	Piloto	Experi- mental	Piloto	Experi- mental
	Temperatura de entrada (°C)	182	134	182	138	182	136
	Temperatura de salida (°C)	87	88	87	89	87	88
	Velocidad de alimentación de líquido (ml/min)	12	3	12	3	13	3
	Volumen de líquido secado (ml)	250	50	250	50	250	50
Rendimiento (%)		99	60	100	65	98	59
Tamaño de partícula (D ₅₀) (µm)		9,6	2,5	8,8	2,8	10,6	5,1
Contenido de agua (%)		4,0	7,6	4,7	6,9	5,0	8,8

Secado por congelación

También se liofilizaron soluciones de anticuerpos monoclonales para comparar la estabilidad en estado seco con muestras secadas por pulverización. Las formulaciones líquidas se dividieron en alícuotas en 1 ml en viales de vidrio de 2 cc con tapones de butilo, después se colocaron en estantes previamente enfriados a -50 °C en un liofilizador (Modelo n.º LYOMAX2®, BOC Edward, Tewksbury, MA). Las muestras se secaron mediante la disminución de la presión a 100 mTorr (13,33 kPa) y el aumento de la temperatura de almacenamiento a -25 °C durante el secado primario, seguido del secado secundario a 35 °C. El tiempo total del ciclo de liofilización fue de aproximadamente 60 horas.

Análisis del tamaño de partícula

La distribución del tamaño de partícula se midió usando un analizador de difracción láser (LA-950, Horiba Instruments, Kioto, Japón). El LA-950 consiste en dos fuentes de luz (LAD de color azul, láser de color rojo), un sistema de manipulación de muestras para controlar la interacción entre las partículas y la luz incidente, y una serie de fotodiodos de alta calidad para detectar la luz dispersa en un amplio intervalo de ángulos. La luz dispersa recogida en los detectores se usó para calcular la distribución del tamaño de partícula de la muestra analizada usando la teoría de Mie. Para muestras secadas por pulverización, se dispersaron varios miligramos de los polvos secos en 50 ml de alcohol isopropílico en la celda MiniFlow fijada a LA-950 y se sometieron a ultrasonidos usando el ultrasonido también fijado a LA-950 durante aproximadamente un minuto antes del análisis. Las partículas suspendidas en vehículos se diluyeron con cada vehículo en FractionCell y se mezclaron con un agitador fijado a LA-950 antes del análisis.

Análisis de densidad

La densidad del polvo se determinó mezclando 500 mg de polvo en 4 ml de aceite de dicaprilato/dicaprato de propilenglicol en un cilindro volumétrico y midiendo el volumen de aceite desplazado como el volumen de polvo. La densidad del polvo puede calcularse usando el peso y el volumen del polvo.

Microscopía electrónica de barrido

Se examinó la morfología superficial de muestras secadas por pulverización usando un microscopio electrónico de barrido ambiental (XL30, FEL, Hillsboro, OR). Cada muestra se montó en adaptadores de aluminio y se recubrió con una capa de 10 nm de AuPd y se escaneó a una tensión de 2 kV y las fotografías se tomaron con aumentos de 1000 y 2000.

Análisis de contenido de agua

Se determinó la humedad residual en muestras secadas por pulverización usando el analizador de titulación Karl Fischer volumétrico (DL31, Mettler-Toledo). Se inyectaron aproximadamente 100 mg de cada muestra en la celda de titulación que contenía metanol anhidro. Se usó reactivo volumétrico compuesto de Hydranal 2 (n.º de cat. 34696, Hiedel-deHaen, Heidelberg, Alemania) como titulador.

Cromatografía de exclusión por tamaño

La cuantificación de variantes de tamaño se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Este análisis utilizó una columna G3000SW_{XL}, DI de 7,8 mm x 30 cm, 5 µm (TOSOH BioScience) ejecutada en un sistema de HPLC (1100, Agilent). Las fases móviles son fosfato de potasio 0,2 M y cloruro de potasio 0,25 M a pH 6,2 para bevacizumab, fosfato de potasio 0,1 M a pH 6,8 para trastuzumab y fosfato de potasio 0,2 M y cloruro de potasio 0,25 M a pH 7,0 para rituximab. La cromatografía se realizó isocráticamente a un caudal de 0,5 ml/min durante 30 minutos. La temperatura de la columna se mantuvo a temperatura ambiente para bevacizumab y rituximab y 30 °C para trastuzumab y se controló la absorbancia del eluyente a 280 nm. Cada anticuerpo monoclonal se diluyó con su respectivo tampón de formulación a 25 mg/ml para bevacizumab y 10 mg/ml para trastuzumab y rituximab. Su volumen de inyección es de 10 µl para bevacizumab y de 20 µl para trastuzumab y rituximab.

Estabilidad física de anticuerpos monoclonales en formulaciones de polvo secado por pulverización y secado por congelación

Se dividieron en alícuotas muestras de polvo secado por pulverización y secado por congelación en un vial de vidrio de 2 cc, aproximadamente 25 anticuerpos monoclonales. Cada vial se selló con un tapón de goma y tapa FLIP-OFF® y se almacenó a 40 °C durante un máximo de 3 meses. En los puntos temporales de estabilidad de tiempo cero (inmediatamente después del secado), 1, 2, 3 meses, cada muestra seca se reconstituyó con 1 ml de agua purificada y la estabilidad física del anticuerpo se determinó por distribución de tamaño de proteína (% de monómero, agregación y fragmentación) usando CET-HPLC.

Preparación de formulaciones de suspensión

El polvo se pesó en un vial de 2 ml. Basándose en la densidad de polvo determinada, se añadió la cantidad apropiada de vehículo de suspensión para preparar la concentración de polvo en la unidad de mg de polvo en 1 ml de volumen de suspensión. Después, las muestras se homogeneizaron durante 2 minutos a 7500 rpm usando una sonda de punta de 0,5 cm en un homogeneizador Tempest Virtishear (Virtis Corp, Gardiner, NY).

Medición de la viscosidad

La viscosidad de las muestras de solución y suspensión se midió usando un reómetro de cono y placa (AR-G2 TA Instrument, New Castle, DE). Cada muestra se cargó en la placa de medición inferior y se dejó que alcanzara el equilibrio térmico a 25 °C. Se usó una trampa de disolvente equipada con AR-G2 para evitar la evaporación de la solución durante la medición. La viscosidad de la muestra se midió cada 10 segundos durante 2 minutos usando un cono con un diámetro de 20 mm y un ángulo de 1 grado a una velocidad de cizalla de 1000 por segundo.

Medición de la fuerza de deslizamiento de la jeringa

Se introdujo un ml de suspensión en una jeringa de aguja fija TW de ½" de 1 ml de longitud 27G (BD, Franklin Lakes, NJ) sellada con un tapón de émbolo (W4023/FLT, West Pharmaceutical, Lionville, PA). El cilindro interno de la jeringa se recubrió con 0,5 mg de aceite de silicona (Dow 360 Medical Fluid, 1000 cSt). Se usó un sistema de ensayo de materiales (Modelo 5542, Instron, Grove City, PA) con una celda de carga para aplicar una tasa de compresión constante de 190 mm/min. El perfil de la fuerza de deslizamiento se analizó y estableció en función de la distancia del vástago del émbolo que se desplaza dentro del cilindro de la jeringa.

Cromatografía de gases inversa (CGI)

Se realizó un experimento de CGI usando un Sistema de Análisis de Energía Superficial (AES) (MSM-iGC 2000, Surface Measurement Services Ltd, Allentown, PA). Se compactaron aproximadamente 200 mg de muestra de polvo en columnas de vidrio silanizadas individuales y ambos extremos de las columnas se sellaron usando lana de vidrio silanizada para evitar el movimiento de la muestra. Las áreas de superficie específicas de las muestras de polvo se determinaron midiendo las isotermas de adsorción de octano a 30 °C y una HR del 0 % a partir del AES por CGI. Las áreas de superficie específicas BET de las muestras se calcularon posteriormente a partir de sus correspondientes isotermas de octano, dentro del intervalo de presión parcial (P/P₀ del 10 % a 35 %). El decano, el nonano, el octano y el heptano se usaron como sondas de alcanos para la determinación de la energía superficial dispersiva. También se midió la energía libre de Gibbs específica basada en ácido usando acetona, acetonitrilo, etanol y acetato de etilo. Para la medición del calor de sorción, los vehículos de suspensión se usaron como sondas de gas. Todas las muestras se preacondicionaron in situ con un gas vehículo de helio a 30 °C durante 2 horas y todas las mediciones se realizaron a 30 °C con un caudal de gas vehículo de 10 cm/seg.

Resultados y discusión

Polvos secados por pulverización de anticuerpo/trehalosa

Se formularon tres tipos de anticuerpos monoclonales en soluciones líquidas que contenían trehalosa, que sirve

como estabilizador de hidrato de carbono para el anticuerpo monoclonal, en la relación de peso de trehalosa:anticuerpo de 1:2 antes del secado por pulverización. Esta relación de peso baja es equivalente a una relación molar de aproximadamente 220:1 utilizada con el fin de minimizar su contribución de volumen, que estaba por debajo de la relación molar mínima de 300:1 utilizada habitualmente para que el azúcar estabilice las proteínas como un lioprotector (Shire *et al.*, *J Pharm Sci* 93: 1390-1402 (2004)). Obsérvese que una suspensión de 400 mg de polvo/ml representa una concentración de 270 mg de anticuerpo/ml incluso en la relación de peso 1:2 de trehalosa:anticuerpo, que se encontraba en el límite inferior de la concentración de anticuerpo diana para el presente estudio.

Se secaron por pulverización tres anticuerpos monoclonales formulados a 100 mg/ml con 50 mg/ml de trehalosa, usando un secador por pulverización a escala experimental (B-191) y un secador por pulverización a escala piloto (MS-35). Las condiciones de secado por pulverización y caracterización del polvo se resumen en la Tabla 2. Se emplearon temperaturas de salida comparables de 87-89 °C para todas las muestras porque la temperatura de salida se consideró el parámetro clave que determina la capacidad de secado por pulverización (Maa *et al.*, *Pharm Dev Technol* 2: 213-223 (1997); Lee G. *Spray Drying of Proteins*, en "*Rational Protein Formulation: Theory and Practice*" (Editores, Carpenter J, Manning M), *Pharmaceutical Biotechnology Series* (Editor Borchardt R). Plenum Press, páginas 135-158 (2002); Maury *et al.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 59: 566-573 (2005); Maa *et al.*, *Biotech. Bioeng.*, 60: 301-309 (1998); y Maa. *Et al.*, *J. Pharm. Sci.* 87: 152-159 (1998)). El secador por pulverización a escala piloto demostró un mejor funcionamiento en el rendimiento de recolección de polvo (> 96 %) y un contenido de agua del 4-5 %, mientras que las muestras secadas mediante el secador por pulverización a escala experimental tenían un rendimiento del 60 % y un contenido de agua del 7-9 %. El secador a escala piloto también fue capaz de producir partículas más grandes de 8-11 µm (D₅₀) mientras que el secador a escala experimental produjo partículas de 2-5 µm (D₅₀). Las ventajas del secador a escala piloto pueden atribuirse al uso eficiente de la energía y a una mayor eficacia de recolección de polvo. La forma y morfología de las partículas para todos los anticuerpos fue generalmente esférica con hoyuelos, que eran dependientes del anticuerpo. El tipo de secador por pulverización no afectó a la morfología de las partículas. En general, el funcionamiento del secador y el tipo de anticuerpo dieron como resultado un cierto grado de variaciones en las propiedades de las partículas. Aunque estas variaciones no son dramáticas, permitieron a los inventores evaluar su efecto sobre el rendimiento de la suspensión.

Estabilidad física de los anticuerpos en formulaciones de polvo secado por pulverización y liofilizado

Una preocupación general sobre el secado por pulverización de productos biológicos era el estrés por las altas temperaturas, en particular para el secador piloto que tenía una temperatura de entrada más alta de > 180 °C. La estabilidad física del anticuerpo de las muestras secas se determinó tras la reconstitución con agua purificada por distribución de tamaño de proteína (% de monómero, agregación y fragmentación) usando CET-HPLC antes y después del secado por pulverización durante 3 meses de almacenamiento a la temperatura acelerada de 40 °C (Figura 1). A pesar de la alta temperatura de secado utilizada en el secador por pulverización a escala piloto, la repercusión del proceso de secado sobre el monómero (%) fue mínimo. La estabilidad física del anticuerpo para bevacizumab y trastuzumab secados por pulverización se comparó con sus homólogos liofilizados mediante el control del cambio en monómero (%) a 40 °C durante 3 meses. El monómero (%) para todas las muestras disminuyó en la condición acelerada debido principalmente a la agregación, lo que no es sorprendente dada la cantidad subóptima de trehalosa para proteger el anticuerpo en la formulación. Sin embargo, las muestras secadas por pulverización tenían una mayor estabilidad física del anticuerpo que las muestras liofilizadas. El monómero (%) de trastuzumab y bevacizumab secados por pulverización disminuyó en el ~2 % y el ~4 % respectivamente, mientras que ambos anticuerpos liofilizados experimentaron una mayor pérdida de monómero (%) del ~6,5 % durante 3 meses, a pesar de su menor contenido de agua del ~0,8 %. Por tanto, el secado por pulverización es un enfoque viable, desde la perspectiva del proceso y la estabilidad, en la fabricación de polvos de anticuerpos para el desarrollo de la formulación de suspensión.

Selección de vehículos de suspensión

El criterio principal para la selección del vehículo de suspensión fue la baja viscosidad, preferentemente < 10 Cp, ya que la viscosidad del vehículo de suspensión contribuiría a la viscosidad de la suspensión de forma lineal basándose en la ecuación de Einstein para la viscosidad de soluciones (Einstein, A., *Annalen der Physik* 34: 591-92 (1911)).

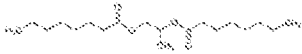
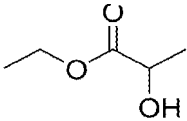
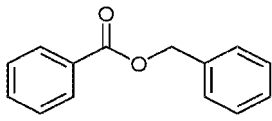
$$\eta = \eta_0 (1 + 2,5\phi) \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde η es la viscosidad de la suspensión, η_0 la viscosidad del vehículo de suspensión puro y ϕ la fracción de volumen del soluto.

Los tres vehículos de suspensión seleccionados para el presente estudio, dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, benzoato de bencilo y lactato de etilo, cumplieron este criterio (Tabla 3). MIGLYOL 840® es diésteres de propilenglicol de ácidos caprílico y cáprico de la familia de aceites neutros MIGLYOL®. MIGLYOL 810® y MIGLYOL 812® han sido aprobados para inyecciones intravenosas e intramusculares, pero son viscosos, > 30 cp a temperatura ambiente. El dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, el menos viscoso de la familia (~9 cp), se ha usado

para aplicaciones transdérmicas (Mahjour *et al.*, *Intl J Pharm* 95: 161-169 (1999); Seniro, W., *Intl J Toxicol* 18: 35-52 (1999)). El benzoato de bencilo es similar al dicaprilato/dicaprato de propilenglicol en su viscosidad, ~9 cp y con frecuencia se ha utilizado como conservante en inyectables líquidos a una concentración del <10 %. El lactato de etilo se ha utilizado habitualmente en preparaciones farmacéuticas, aditivos alimentarios y fragancias debido a su toxicidad relativamente baja. Aunque el lactato de etilo todavía no se ha aprobado por vía parenteral, tiene una baja toxicidad en ratones para inyección intramuscular e intravenosa (Spiegel y Noseworthy, *J Pharm Sci* 52: 917-927 (1963); Mottu et al., *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 54: 456-469 (2000)). El lactato de etilo tiene una viscosidad similar al agua, ~2 cp.

10 **Tabla 3: Información sobre la estructura, la viscosidad y la aplicación farmacéutica de tres vehículos de suspensión modelos sometidos a ensayo en el presente estudio**

	Miglyol 840	Lactato de etilo	Benzoato de bencilo
Estructura			
Viscosidad (cp) a 20 °C	9	2	9
Aplicaciones farmacéuticas	No aprobado actualmente para su uso parenteral, pero se han realizado algunos estudios de toxicidad en animales para determinar la entrega cutánea	Utilizado como potenciador del sabor para medicamentos de dosis orales. No aprobado para el uso parenteral, pero está disponible la toxicidad aguda en ratones por SC e IV	Utilizado como conservante en forma de dosificación líquida para la administración parenteral en cantidades inferiores al 10 %

15 Efecto del tipo de anticuerpo y de las propiedades del polvo sobre la viscosidad de la suspensión

15 Todos los anticuerpos secados mediante secadores por pulverización tanto a escala experimental como a escala piloto (Tabla 2) se suspendieron en dicaprilato/dicaprato de propilenglicol. La viscosidad de la suspensión se midió en función de la concentración de anticuerpo y se comparó con las soluciones líquidas de anticuerpo (Figura 2). La viscosidad de la suspensión para todos los anticuerpos fue similar en el intervalo de concentraciones de anticuerpos

20 sometido a ensayo, lo que sugiere que las variaciones en los tipos de anticuerpos y las propiedades del polvo (tamaño de partícula, morfología y contenido de humedad) tuvieron poco efecto sobre la viscosidad de la suspensión. La viscosidad de la suspensión aumentó al aumentar la concentración de anticuerpos de manera exponencial, que puede expresarse como:

$$\eta_{\text{Miglyol 840}} = 8,24e^{0,0088(\text{conc. de polvo})} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Ciertamente, es muy diferente de la ecuación de Einstein (Ecuación 2) que es principalmente para suspensiones diluidas. La Ecuación 4, una versión modificada de la Ecuación 2, tomó en consideración las interacciones de suspensiones más concentradas (Kunitz, M., J. *General Physiology* páginas 715-725 (julio de 1926)), sin embargo,

30 subestimó significativamente los datos empíricos (véase la línea de trazos en la Figura 2).

$$\eta/\eta_0 = (1 + 0,5\phi) / (1 - \phi)^4 \quad (\text{Ecuación 4})$$

Fue interesante encontrar que la viscosidad de la suspensión era en realidad más alta que la viscosidad de la solución líquida del anticuerpo correspondiente a la misma concentración de anticuerpo. No se observó ninguna diferencia en la viscosidad de la suspensión entre los anticuerpos, aunque el tipo de anticuerpo sí afectó significativamente a la viscosidad del líquido.

40 Energías de superficie de los polvos secados por pulverización por CGI

Kanai y colaboradores (Kanai et al., *J. Pharm. Sci* 97: 4219-4227 (2005)) descubrieron una autoasociación reversible como resultado de las interacciones Fab-Fab en su estudio de viscosidad sometido a ensayo con dos anticuerpos fabricados a partir de la misma construcción con diferentes secuencias de aminoácidos en la región determinante de la complementariedad (CDR) en soluciones acuosas. Dichas diferencias de viscosidad debido a los tipos de anticuerpos en suspensiones de polvo en vehículos no acuosos no se observaron (Figura 2). Esta observación podría interpretarse desde la perspectiva de la distribución de energía de la superficie de las partículas en la suspensión de polvo. La energía de superficie de las partículas, la combinación de componentes de energía polares y no polares (dispersivos), puede dictar el nivel de interacción con vehículos de suspensión y partículas. La CGI es una herramienta común para la medición de la energía de superficie. La energía de superficie dispersiva de las

partículas usando decano, nonano, octano y heptano como sondas y también la energía libre de Gibbs de ácido-base (polar) específica se midió usando acetona, acetato de etilo, etanol y acetonitrilo como sondas. La energía superficial es una distribución en respuesta a la distribución del tamaño de partículas de la muestra de polvo, pero en la Tabla 4 solo se notificaron energías de superficie al 50 %. La energía superficial dispersiva, γ_{50} , estaba en un intervalo estrecho de 36 a 38 mJ/m² para los tres anticuerpos. Las diferencias en la energía libre de Gibbs de ácido-base específica, ΔG_{50} , de estos anticuerpos en respuesta a las cuatro sondas ácido-base también estaban en un intervalo estrecho de 8 a 13 mJ/m². La distribución de energía de superficie comparable entre los tres polvos de anticuerpos podría explicar interacciones similares partícula-vehículo de suspensión y partícula-partícula, conduciendo a su viscosidad de suspensión comparable en dicaprilato/dicaprato de propilenglicol (Figura 2).

Tabla 4: Energía de superficie dispersiva (γ_{50}), energía libre de Gibbs de ácido-base específica (ΔG_{50}) y calor de sorción de polvos de anticuerpos monoclonales secados por pulverización (todas medidas usando CGI)

Polvo	Vehículos de suspensión	γ_{50} (mJ/m ²)	ΔG_{50} (mJ/m ²)	Calor de sorción $\Delta H_{\text{sorción}}$ (KJ/mol)
Bevacizumab	Decano, nonano, octano y heptano	37,5		
Trastuzumab	Decano, nonano, octano y heptano	36,8		
Rituximab	Decano, nonano, octano y heptano	38,3		
Becavizumab	Acetona		8,4	
	Acetato de etilo		6,2	
	Etanol		14,8	
	Acetonitrilo		12,9	
Trastuzumab	Acetona		8,2	
	Acetato de etilo		6,6	
	Etanol		14,5	
	Acetonitrilo		12,7	
Rituximab	Acetona		8,4	
	Acetato de etilo		7,3	
	Etanol		14,9	
	Acetonitrilo		12,8	
Becavizumab	Dicaprilato/dicaprato de propilenglicol			39,9 ± 0,5
	Benzoato de bencilo			36,5 ± 0,7
	Lactato de etilo			51,5 ± 0,3
Rituximab	Dicaprilato/dicaprato de propilenglicol			43,4 ± 0,5
	Benzoato de bencilo			42,8 ± 0,6
	Lactato de etilo			58,5 ± 0,4

Inyectabilidad de suspensiones en tres vehículos

La capacidad de inyección puede controlarse mediante la medición de la fuerza de deslizamiento, que es un indicador de mantenimiento más pertinente que la medición de la viscosidad. La fuerza de deslizamiento de la suspensión de polvo de rituximab en tres vehículos se determinó en función de la concentración de anticuerpos inyectando una suspensión de 1 ml usando una jeringa de 1 ml de longitud a través de una aguja fija TW de calibre 27 en 10 segundos (Figura 3). La fuerza de deslizamiento para todas las suspensiones aumentó con la concentración de anticuerpos, sin embargo, estaba por debajo de 20 N incluso a una concentración de anticuerpos de 200 mg/ml a pesar de la alta viscosidad (Figura 2). La fuerza de deslizamiento prevista para las soluciones líquidas de anticuerpo extraídas de la Figura 4 en la Referencia 3 fue mayor que la fuerza de deslizamiento de la suspensión. La fuerza de deslizamiento en la suspensión de lactato de etilo fue la más baja entre los tres vehículos de suspensión sometidos a ensayo. La fuerza de deslizamiento de la suspensión de lactato de etilo a 333 mg de anticuerpo/ml fue equivalente a la de los otros dos vehículos de suspensión a aproximadamente la mitad de la concentración de anticuerpo (167 mg/ml), que todavía estaba por debajo del umbral diana de 15 Newton, incluso a una alta concentración de anticuerpos de 333 mg/ml. Las razones de la discrepancia en la relación viscosidad-fuerza de deslizamiento entre la solución líquida y la suspensión no están claras.

Efecto del vehículo de suspensión sobre la viscosidad de la suspensión

La viscosidad de la suspensión se sometió a ensayo en tres vehículos que contenían el polvo de rituximab seco por pulverización (Figura 4). La viscosidad en lactato de etilo fue la más baja entre los tres vehículos; la viscosidad de la suspensión de lactato de etilo a 333 mg de anticuerpo/ml fue equivalente a la de la suspensión en

dicaprilato/dicaprato de propilenglicol y benzoato de bencilo a aproximadamente la mitad de la concentración de anticuerpo (167 mg/ml).

Calor de sorción por CIG y tamaño de partícula

El calor de sorción ($\Delta H_{\text{sorción}}$) es una medida directa de la fuerza de las interacciones entre un sólido y moléculas de gas adsorbidas sobre la superficie (Thielmann F., *"Inverse gas chromatography: Characterization of alumina and related surfaces"*, en *"Enciclopedia of Surface and Colloid Science"* Volumen 4 (edición de P. Somasundaran) CRC Press, Boca Ratón, FL., páginas 3009-3031 (2006); Thielmann y Butler, *"Heat of sorption on microcrystalline cellulose by pulse inverse gas chromatography at infinite dilution"*, Nota de Solicitud de Servicios de Medición de Superficies 203 (http://www.thesorptionssolution.com/Information_Application_Notes_IGC.php#Aps) (2007)).

El método por CGI se empleó para medir el calor de sorción entre las partículas secadas por pulverización y los vehículos de suspensión (Tabla 4). Tanto para bevacizumab como para rituximab, la suspensión de lactato de etilo tuvo un mayor calor de sorción que los otros dos vehículos de suspensión. El tamaño de partícula de las partículas en suspensión también se comparó entre las tres suspensiones (Figura 5). El tamaño de partícula máximo (el porcentaje más alto) fue de 28, 25 y 7 μm para dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, benzoato de bencilo y lactato de etilo, respectivamente. Tanto el calor de sorción como el tamaño de partícula muestran que el mayor calor de sorción en suspensiones de lactato de etilo indica una mayor interacción partícula-vehículo de suspensión que la interacción partícula-partícula y que el grado de autoasociación de partículas en lactato de etilo fue menor que en dicaprilato/dicaprato de propilenglicol o benzoato de bencilo.

Estabilidad física de la suspensión

A pesar de la viscosidad y la fuerza de deslizamiento bajas en la suspensión de lactato de etilo, mostró una peculiar estabilidad física de la suspensión en función del tiempo. El polvo en la suspensión de lactato de etilo sedimentó en el fondo y flotó a la superficie de la suspensión después de un almacenamiento ambiental de 1 día (Figura 6A). La homogeneidad de la suspensión de lactato de etilo podría restablecerse mediante agitación con formación de vórtice (Figura 6B). Por el contrario, la estabilidad física de la suspensión en dicaprilato/dicaprato de propilenglicol fue mucho más estable y permaneció bien suspendida durante dos semanas (Figura 6C).

De acuerdo con la tasa de sedimentación de partículas determinada por la Ley de Stoke (Ecuación 4 a continuación), las partículas en lactato de etilo se sedimentan aproximadamente 4,5 veces más rápido que en dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, según la densidad y viscosidad del lactato de etilo y el dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, 1,03 g/cm³ y 0,92 g/cm³ y 2 cP y 9 cP, respectivamente. Por tanto, la ley de Stoke por sí sola no podía explicar completamente la observación de la sedimentación extremadamente rápida de las partículas en lactato de etilo en comparación con dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, sugiriendo que otros mecanismos tales como la carga eléctrica superficial (es decir, el potencial zeta) pueden desempeñar un papel. Sin embargo, el fenómeno de algunas de las partículas que flotan en la parte superior de la superficie del lactato de etilo es difícil de explicar debido a que la densidad de las partículas secadas por pulverización es mayor que la del lactato de etilo.

$$s = d (\rho_s - \rho_l)g / (18\eta) \quad (\text{Ecuación 5})$$

donde s es la tasa de sedimentación, d el diámetro de la partícula, ρ_s la densidad de la partícula, ρ_l la densidad del vehículo de suspensión, g la aceleración debida a la gravedad y η la viscosidad del vehículo de suspensión.

Mezcla de vehículo de suspensión para mejorar el rendimiento de la suspensión

Las mezclas de lactato de etilo y dicaprilato/dicaprato de propilenglicol se usaron como vehículos de suspensión para someter a ensayo la estabilidad física de la suspensión de rituximab. El tamaño de partícula se determinó para estas suspensiones de mezcla (Figura 7A). El tamaño de partícula disminuyó con una contribución decreciente de dicaprilato/dicaprato de propilenglicol en la mezcla donde el tamaño de partícula máximo fue de 28, 13, 11,8 y 7 μm para la mezcla de dicaprilato/dicaprato de propilenglicol:lactato de etilo a 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 y 0:100, respectivamente. Desde la perspectiva de la estabilidad física de la suspensión, se mejoró la mala estabilidad de la suspensión del lactato de etilo mezclando con una pequeña cantidad de dicaprilato/dicaprato de propilenglicol como se demuestra en la Figura 7B donde se mantuvo una suspensión homogénea para el polvo de rituximab en mezcla 25:75 de dicaprilato/dicaprato de propilenglicol:lactato de etilo después de un almacenamiento ambiental de 2 semanas. Se demostró que el rendimiento general de la suspensión puede mejorarse usando una mezcla de vehículo de suspensión.

Conclusión

Estos ejemplos demostraron que el enfoque de suspensión en polvo no acuosa fue factible para la administración SC de alta concentración de anticuerpos monoclonales. La preparación de polvo seco mediante secado por pulverización fue escalable usando el proceso de secado por pulverización de alta eficiencia. El parámetro más

importante para el rendimiento general de la suspensión se determinó como el tipo de vehículo de suspensión. La suspensión de polvo en lactato de etilo mostró una excelente inyectabilidad en suspensión con una fuerza de deslizamiento baja de < 15 N a través de una aguja fija TW de calibre 27 para una concentración de anticuerpo tan alta como de 333 mg/ml (concentración total de polvo de 500 mg/ml). Sin quedar ligado a teoría alguna, la viscosidad y la inyectabilidad bajas podrían atribuirse a la fuerte interacción partícula-vehículo de suspensión que evita la aglomeración partícula-partícula en un tamaño de partícula mayor en la suspensión. Sin embargo, este mecanismo no respaldó la estabilidad de la suspensión física. Las partículas de anticuerpo seco tenían una mayor tendencia a sedimentar en la suspensión de lactato de etilo que en el dicaprilato/dicaprato de propilenglicol. El enfoque del uso de la mezcla del vehículo de suspensión demostró ser eficaz en la mejora del rendimiento general de la suspensión.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC. ET AL.

<120> FORMULACIONES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES DE ALTA CONCENTRACIÓN

<130> P4910R1-WO

<140>

<141>

<150> 61/649.146

<151> 18-05-2012

<160> 30

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 451

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 1

ES 2 682 761 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	20	25	30	
Asn	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	35	40	45	
Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	50	55	60	
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asn	Val	Trp	Gly	100	105	110	
Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	115	120	125	
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	130	135	140	

ES 2 682 761 T3

Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	145	150	155	160
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	165	170	175	
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	180	185	190	
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	195	200	205	
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	210	215	220	
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	225	230	235	240
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	245	250	255	
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	260	265	270	
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	275	280	285	
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	290	295	300	
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	305	310	315	320
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	325	330	335	
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	340	345	350	
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	355	360	365	
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	370	375	380	
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro				

ES 2 682 761 T3

```

385                               390                               395                               400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
      405                               410                               415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
      420                               425                               430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
      435                               440                               445

Pro Gly Lys
      450

```

```

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

10 <220>
   <221> fuente
   <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"

   <400> 2

```

ES 2 682 761 T3

Gln	Ile	Val	Leu	Ser	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Leu	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	1	5	10	15
Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Ile	20	25	30	
His	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Tyr	35	40	45	
Ala	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Val	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	50	55	60	
Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	65	70	75	80
Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Thr	Ser	Asn	Pro	Pro	Thr	85	90	95	
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	100	105	110	
Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	115	120	125	
Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	130	135	140	
Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	145	150	155	160
Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	165	170	175	
Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	180	185	190	
Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	195	200	205	
Asn	Arg	Gly	Glu	Cys												210			

<210> 3
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 682 761 T3

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"

5 <400> 3

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
          20          25          30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50          55          60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
          100          105          110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala
115 120
  
```

10 <210> 4
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"

20 <400> 4

ES 2 682 761 T3

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 5

Ser Tyr Asn Met His
1 5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 6

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"
 5 <400> 7

 Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val
 1 5 10

 10 <210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 8

 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His
 20 1 5 10

 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"
 30 <400> 9

 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

 35 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 10
 45

 Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
 1 5

 50 <210> 11
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 55 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"

 <400> 11

ES 2 682 761 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	20	25	30	
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	35	40	45	
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp	Phe	50	55	60	
Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Lys	Tyr	Pro	His	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	100	105	110	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	115	120	125	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	130	135	140	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	145	150	155	160
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	165	170	175	

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

420

425

430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 12

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 12

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	1	5	10	15
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr	20	25	30	
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Val	Leu	Ile	35	40	45	
Tyr	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	65	70	75	80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Thr	Val	Pro	Trp	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	100	105	110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	115	120	125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	130	135	140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	145	150	155	160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	165	170	175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	180	185	190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	195	200	205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	210													

<210> 13
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 682 761 T3

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"

5 <400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14

10 <211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 14

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 15

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 15

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
1 5 10

15

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

25

<400> 16

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

5 <400> 17

Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

10 <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 18

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

20

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

30

<400> 19

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser
 1 5

35 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 20

45

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr
 1 5

50 <210> 21
 <211> 449

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 21

ES 2 682 761 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	20	25	30	
Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	35	40	45	
Ala	Arg	Ile	Tyr	Pro	Thr	Asn	Gly	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	100	105	110	
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	115	120	125	
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	130	135	140	
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	145	150	155	160
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	165	170	175	
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	180	185	190	
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	195	200	205	

ES 2 682 761 T3

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 22
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 22

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195

200

205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 23

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 23

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15

<210> 24

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético"

25

<400> 24

ES 2 682 761 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 25

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His
1 5 10

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 26

Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

5 <400> 27

Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

10 <210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 28

20 **Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala**
1 5 10

<210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

30 <400> 29

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

35 <210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético"

45 <400> 30

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de suspensión que comprende un anticuerpo monoclonal secado por pulverización a una concentración de aproximadamente 200 mg/ml o más suspendido en un vehículo de suspensión no acuoso, en la que la viscosidad del vehículo de suspensión es inferior a aproximadamente 20 centipoise a aproximadamente 25 °C y en la que el vehículo de suspensión no acuoso comprende lactato de etilo.
2. La formulación de la reivindicación 1 en la que la viscosidad del vehículo de suspensión es (i) inferior a aproximadamente 10 centipoise o (ii) inferior a aproximadamente 5 centipoise.
3. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que la fuerza de deslizamiento de inyección de la formulación es de (i) aproximadamente 20 Newton o menos o de (ii) aproximadamente 15 Newton o menos.
4. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que el tamaño promedio de partícula en la formulación es de (i) aproximadamente 2 micrómetros a aproximadamente 30 micrómetros o de (ii) aproximadamente 2 micrómetros a aproximadamente 10 micrómetros.
5. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que la concentración de anticuerpo en la formulación es de (i) aproximadamente 200 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml o de aproximadamente 200 mg/ml a aproximadamente 350 mg/ml.
6. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende adicionalmente (a) un sacárido y/o (b) un tensioactivo.
7. La formulación de la reivindicación 6(a) en la que (i) el sacárido es trehalosa o sacarosa y/o (ii) la relación molar de sacárido:anticuerpo monoclonal es de aproximadamente 50 a aproximadamente 400:1 o de aproximadamente 100 a aproximadamente 250:1.
8. La formulación de la reivindicación 6(b) en la que el tensioactivo es polisorbato 20 o polisorbato 80.
9. La formulación de cualquiera de una de las reivindicaciones anteriores que es adecuada para la administración subcutánea.
10. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que el anticuerpo monoclonal (i) es un anticuerpo monoclonal de longitud completa y/o (ii) es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano, y/o (iii) se une a un antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en: CD20, HER2, VEGF, IL6R, beta7, Abeta, HER3, EGFR y M1'.
11. La formulación de las reivindicaciones 10(i) o 10(iii), en la que el anticuerpo monoclonal es un IgG1 humano, o en la que el anticuerpo es rituximab, trastuzumab o bevacizumab, respectivamente.
12. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el vehículo de suspensión no acuoso comprende una mezcla de dicaprilato/dicaprato de propilenglicol y lactato de etilo.
13. Un dispositivo de administración subcutánea con la formulación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores dentro del mismo.
14. El dispositivo de la reivindicación 13 que comprende una jeringa precargada.
15. Un método de fabricación de una formulación de suspensión que comprende suspender un anticuerpo monoclonal secado por pulverización en un vehículo de suspensión no acuoso con una viscosidad inferior a aproximadamente 20 centipoise a aproximadamente 25 °C, en donde la concentración de anticuerpos monoclonales en la formulación de suspensión es de aproximadamente 200 mg/ml o más y en donde el vehículo de suspensión no acuoso comprende lactato de etilo.
16. Un método de fabricación de un artículo de fabricación que comprende cargar un dispositivo de administración subcutánea con la formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
17. Una formulación de suspensión de la reivindicación 1 que comprende un anticuerpo monoclonal IgG1 humano de longitud completa secado por pulverización a una concentración de aproximadamente 200 mg/ml a aproximadamente 400 mg/ml suspendido en un vehículo de suspensión no acuoso con una viscosidad inferior a aproximadamente 20 centipoise a aproximadamente 25 °C, en donde la formulación tiene un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 2 micrómetros a aproximadamente 10 micrómetros y una fuerza de deslizamiento de inyección inferior a aproximadamente 15 Newton, y en donde el vehículo de suspensión no acuoso comprende lactato de etilo.

18. La formulación de la reivindicación 17, que (i) comprende adicionalmente sacárido, en la que la relación molar de sacárido:anticuerpo monoclonal es de aproximadamente 100 a aproximadamente 250:1 y/o (ii) en la que el anticuerpo es rituximab, trastuzumab o bevacizumab.

5 19. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno en un paciente.

20. La formulación para el uso de la reivindicación 19 en donde la formulación se administra (i) por vía subcutánea al paciente y/o (ii) mediante una jeringa precargada que contiene la formulación dentro de la misma.

10

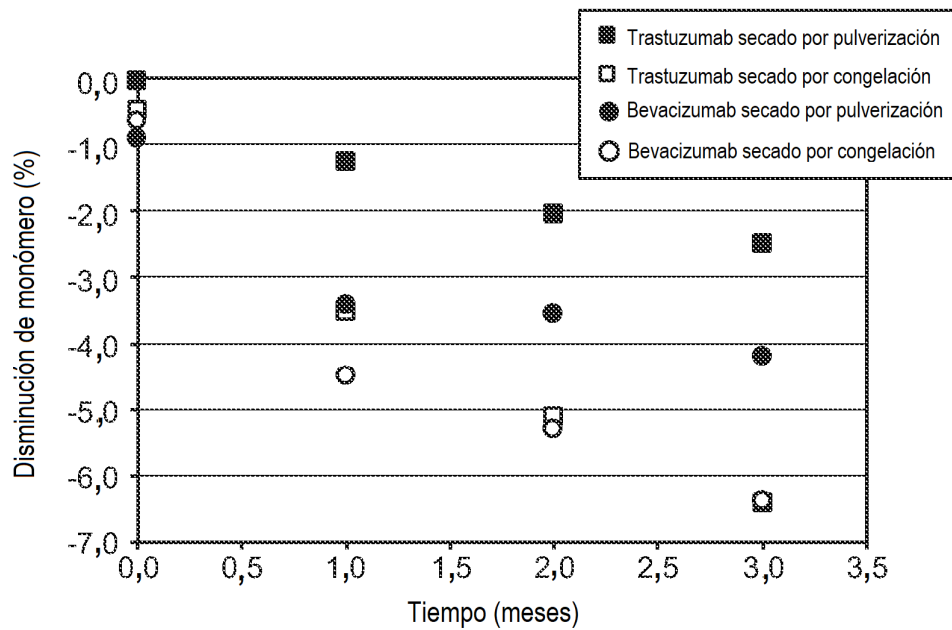


FIG. 1

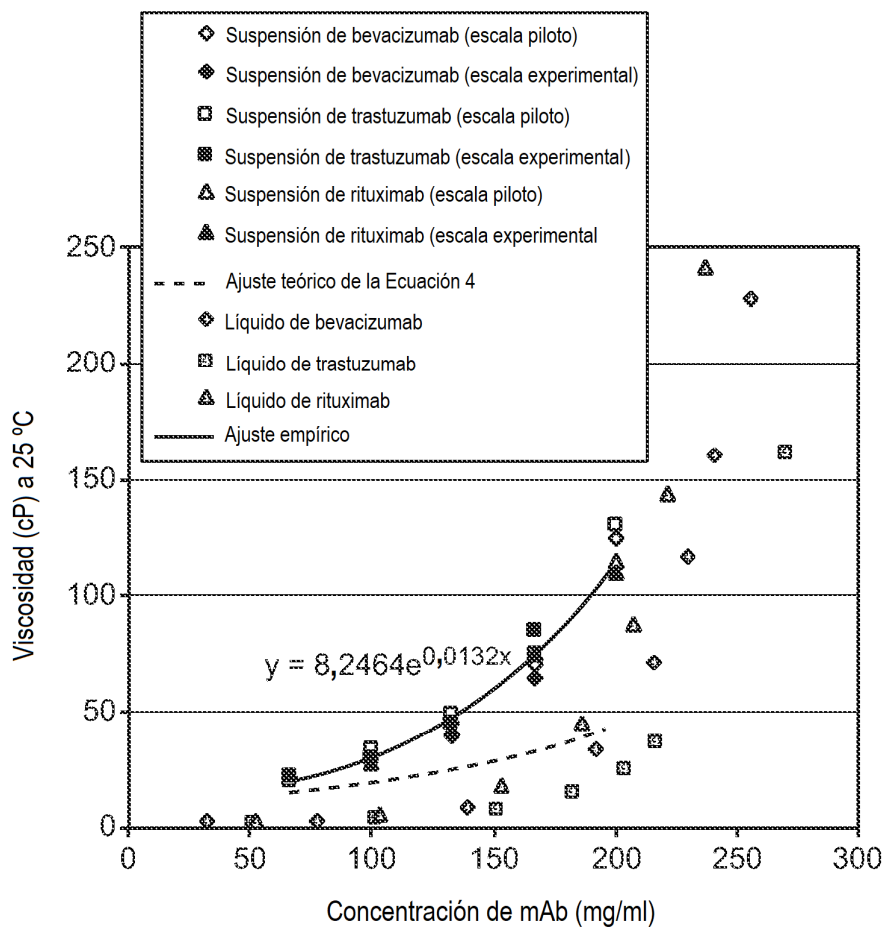


FIG. 2

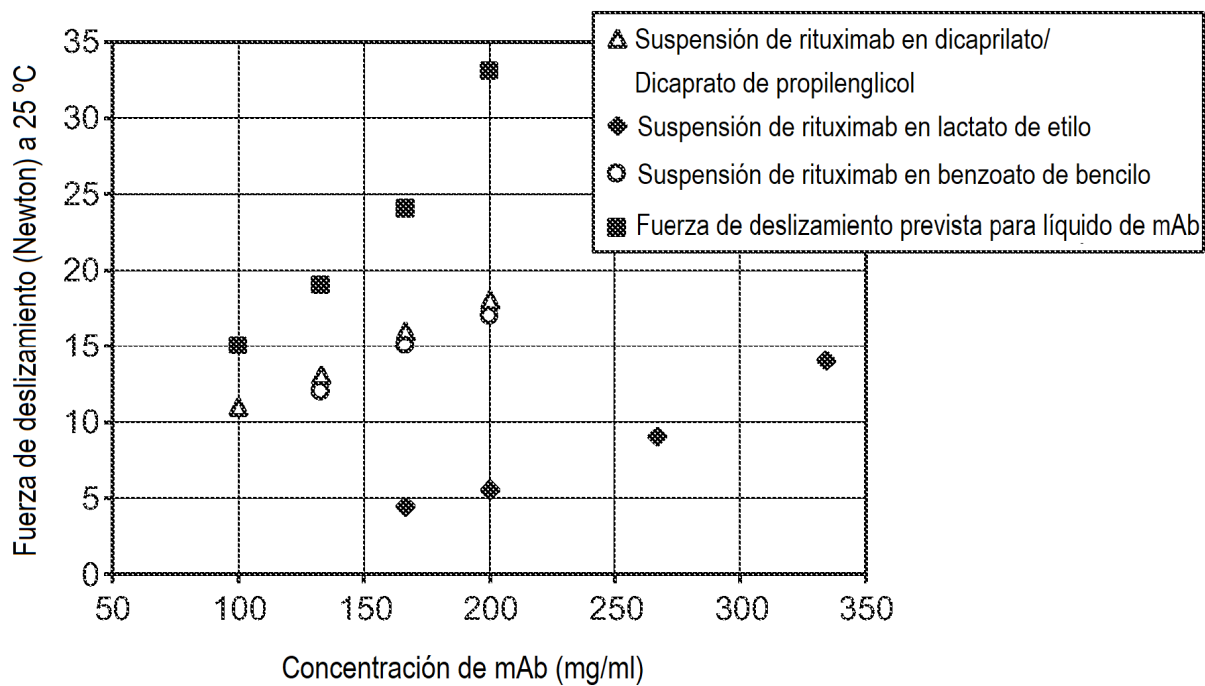


FIG. 3

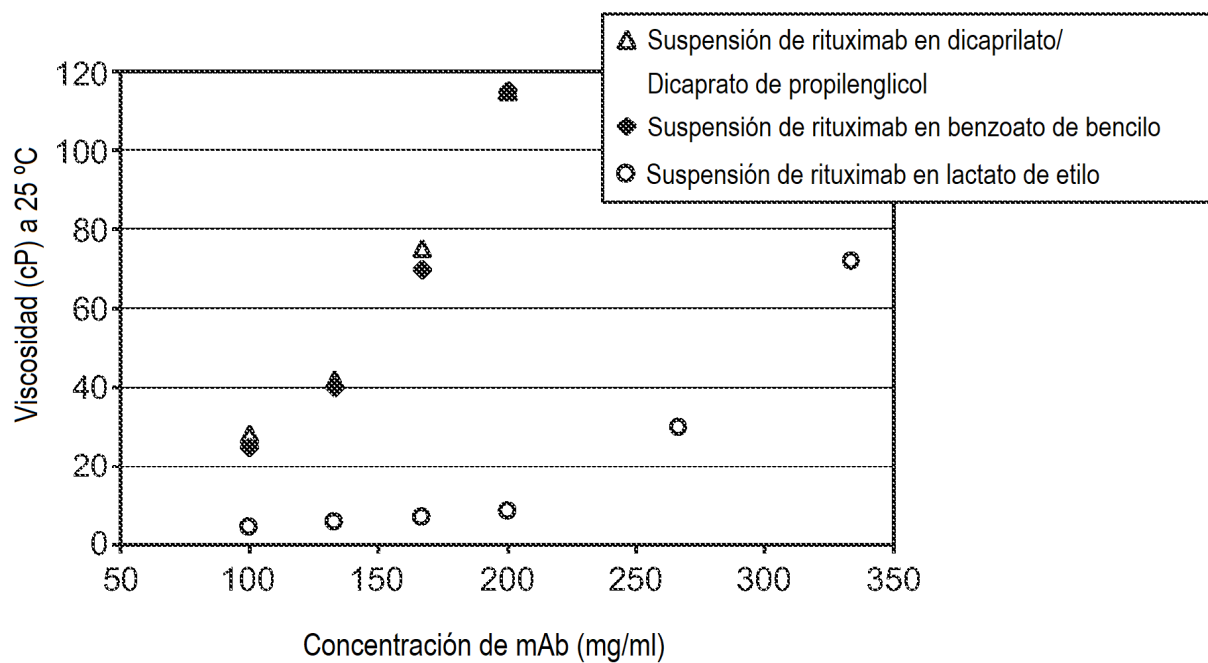


FIG. 4

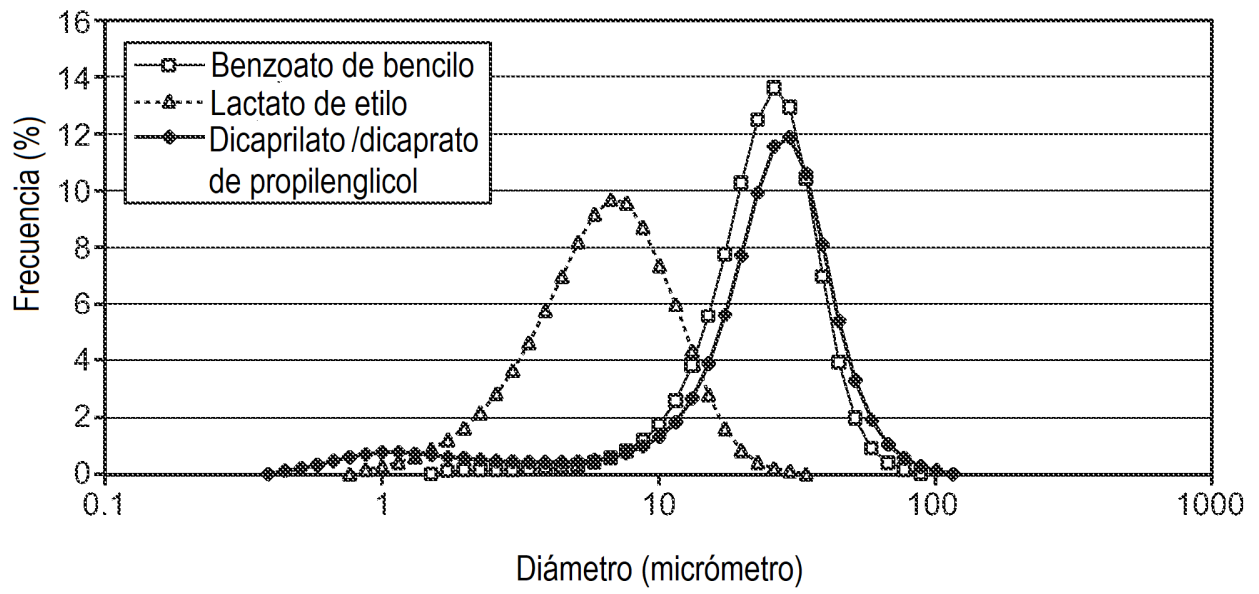


FIG. 5

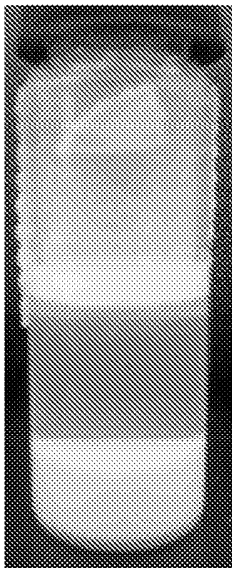


FIG. 6A

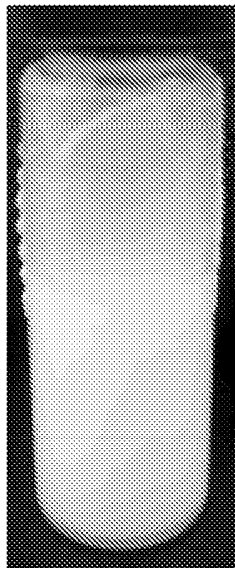


FIG. 6B

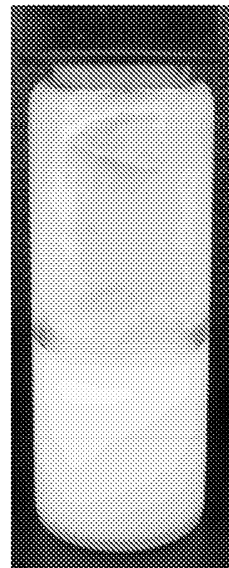


FIG. 6C

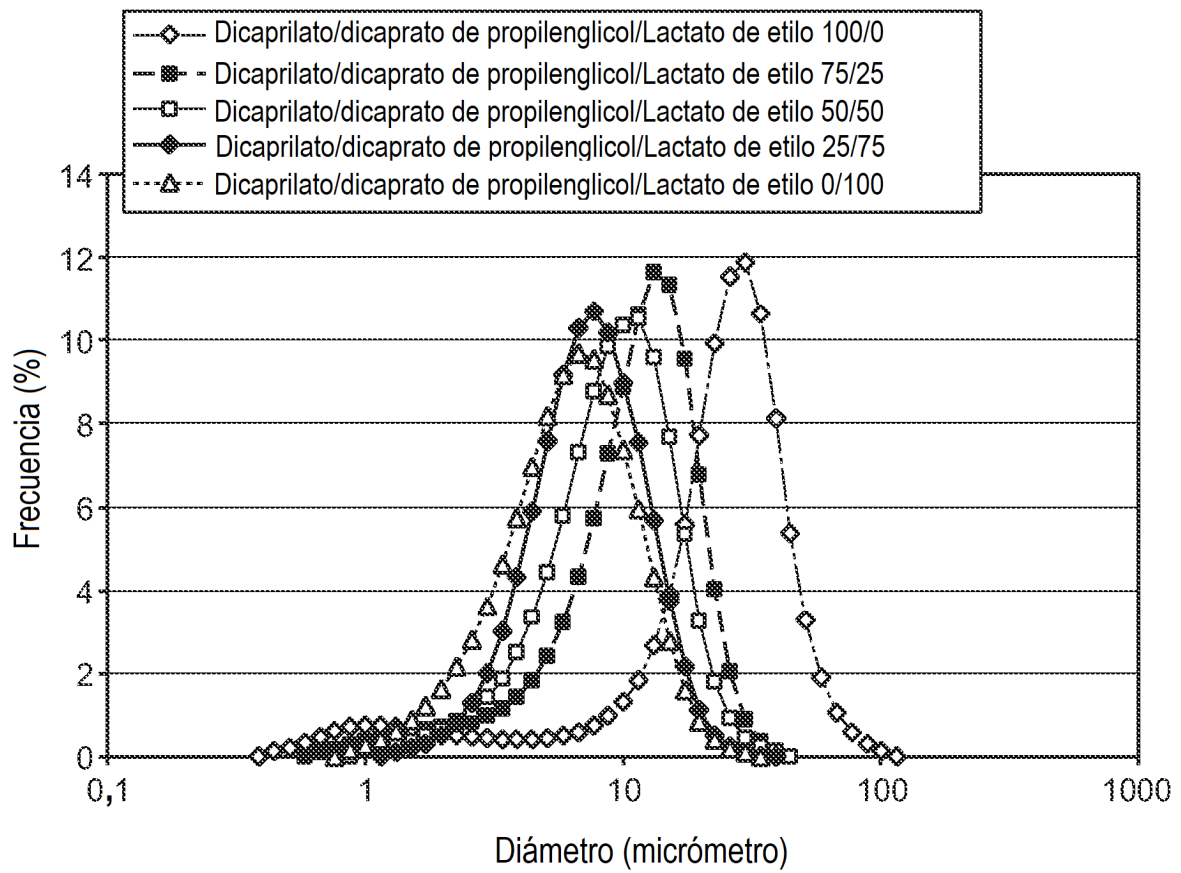


FIG. 7A

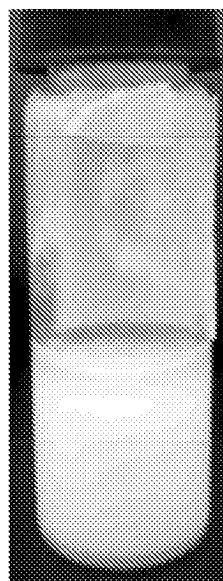


FIG. 7B

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Lys	220	222	225	230	232	235
240	243	244	Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys	250		
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Pro Ser Val Phe			270			
260						
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr			290	292		
280						
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val				310	314	317
295 296 299 300						
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser			330			
320						
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys				350	355	
340						
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile						
357	360	361	363	370		
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg						
378 381				390		
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Lys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro						
400	402	405	408	410	413	420
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr						
			428	430	433	440
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val						
450						460
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala						
			470			478
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys TER						N.º de aminoácido (Kabat)

FIG. 8A-2

Cadena ligera de rituximab

	+1	FR1	10
	Gln	Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser	
	20	CDR1	27/ 29 30 34
Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys	Arg	Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His	
35	FR2	45	CDR2
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr	Ala Thr Ser Asn		
55	56	57	60
Leu Ala Ser	Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser		
75	80		85
Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys	Gln Gln Trp		
CDR3	95	97	98
Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	Arg Thr Val		
			120
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr			

Kappa humana constante

130	140
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp	
150	160
Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp	
170	180
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr	
190	200
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val	
210	214
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys TER	

N.º de aminoácido (Kabat)

FIG. 8B

Cadena pesada de bevacizumab

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGE
PTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWG
QGT~~LVTVSS~~||ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTH~~TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY~~
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV~~FSCSV~~MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 9A

Cadena ligera de bevacizumab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVL~~IYFTSSSLHSG~~
VPSRFGSGSGTDFTLT~~ISSLPEDFATYYCOOYSTVPWTFGQGTKVEIKR~~||TVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASV~~VCLLN~~NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSS~~TLT~~LSKADYEKKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 9B

Cadena pesada de TRASTUZUMAB

```

1      15      30      45
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS[GFNIKDTYIH]WVRQAPGKGL
46      60      75
EWVARITYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED
91      105      120      135
TAVYYSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS[ASTKGPSPVFP]LAPSS
136      150      165      180
KSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALLTSGVHTFPAVQLQSS
181      195      210      225
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
226      240      255      270
THTCPPCPAPELLGGPSPVFLFPKPKD TLMISRTP E V T C V V D V S
271      285      300      315
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY[NS]T Y R V S V L T V L H Q D
316      330      345      360
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEK T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E
361      375      390      405
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNNYKTTTPVLDSDG
406      420      435      449
SFFLYSKLTVDKSRWQQGQNVFSCSVMH E A L H N H Y T Q K S L S L S P G

```

FIG. 10A

1	DIQMTQSSLSASVGD	15	30	45
	RTITCRA			
	SDVNTAV			
	AWYQQKPGKAPK			
46	LLIY	60	75	90
	SASF			
	LYS			
	GVPSSR			
	FGSGTDF			
	TLTIS			
	SLQPE			
	DFATY			
	YC			
91	HYTTPPT	105	120	135
	FGQGTKEIKR			
	TVAA			
	PSVFI			
	PPSDE			
	QLKSG			
	TASV			
	VC			
136	LNNFYPREAKVQ	150	165	180
	WKNALQ			
	SGNSQ			
	ESVTE			
	QDSK			
	DSL			
	SSL			
	TLT			
181	LSKADYEKKHVYA	195	210	214
	CEVTHQ			
	GLSS			
	PPVT			
	KSFN			
	RGE			
	C			

FIG. 10B