

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 645**

51 Int. Cl.:

A61K 31/537 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 47/18 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2014 PCT/EP2014/072558**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2015 WO15059147**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2014 E 14786915 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3060256**

54 Título: **Una nueva formulación estable**

30 Prioridad:

25.10.2013 EP 13190276

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.12.2019

73 Titular/es:

**BAYER PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT
(100.0%)
Müllerstrasse 178
13353 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**OLBRICH, CARSTEN y
TRILL, THOMAS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 735 645 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

Una nueva formulación estable

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una formulación estable como se define en las reivindicaciones particularmente adecuada para el inmunocombinado anti-mesotelina MF-T-SPDB-DM4. La formulación acuosa estable descrita que comprende MF-T-SPDB-DM4 es directamente adecuada para aplicaciones terapéuticas y para la posterior liofilización. El polvo liofilizado se puede reconstituir con agua para crear una solución reconstituida que también es adecuada para aplicaciones terapéuticas. Otro objetivo es proporcionar una formulación de proteína reconstituida estable que sea adecuada para administraciones terapéuticas.

Antecedentes de la invención

10 La terapia basada en anticuerpos está demostrando ser muy efectiva en el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluyendo tumores sólidos. Crucial para el desarrollo de una terapia basada en anticuerpos con éxito es el aislamiento de anticuerpos contra proteínas de superficie celular que se han descubierto que se expresan de forma preferente sobre las células tumorales. El polipéptido precursor de la mesotelina es una proteína de superficie celular glicosilada
15 anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) que se escinde proteolíticamente a un polipéptido secretado N-terminal de 30 kDa y un polipéptido C-terminal de a 40 kDa, que predominantemente está en forma anclada a GPI unida a la membrana (Chang, K. y I. Pastan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1996) 93(1):136), y que en el presente documento se denomina mesotelina. La mesotelina se expresa preferentemente en ciertas células tumorales, particularmente células de mesotelioma, células tumorales pancreáticas y células de carcinoma ovárico, mientras que su expresión está
20 limitada en el tejido normal, por lo que es un objetivo atractivo para el desarrollo de la terapia de tumores (Argani, P. y col., Clin. Cancer Res. (2001) 7(12): 3862; Hassan, R., y col., Clin. Cancer Res. (2004) 10(12 Pt 1):3937).

Anticuerpos anti-mesotelina incluyendo MF-T, fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno y las variantes de estos anticuerpos se han descrito en el documento WO2009/068204. Los anticuerpos descritos tienen características especiales que los hacen muy adecuados para su uso como inmunocombinados. Un inmunocombinado está compuesto
25 por un anticuerpo que reconoce específicamente un antígeno de células diana, tal como un antígeno de células tumorales y una o varias moléculas de un fármaco unidas covalentemente, particularmente un fármaco citotóxico, tal como un maitansinoide. Inmunocombinados compuestos por anticuerpos anti-mesotelina, fragmentos de anticuerpos y variantes de estos anticuerpos y fragmentos unidos a un agente quimioterapéutico, por ejemplo maitansinoides, o derivados de los mismos, se han descrito en el documento WO2010/124797. Una realización preferida especial de un
30 inmunocombinado anti-mesotelina es MF-T-SPDB-DM4 descrita con detalle en el documento WO2010/124797.

A diferencia de los medicamentos tradicionales orgánicos e inorgánicos, los medicamentos basados en anticuerpos son más grandes y más complejos. Esto hace que sea más difícil desarrollar formulaciones que conserven los fármacos basados en anticuerpos en su forma biológicamente activa y eviten la degradación. La degradación puede tener lugar debido a la inestabilidad química (que da como resultado una nueva entidad química) o inestabilidad física.
35 La conjugación de fármacos, especialmente fármacos citotóxicos, que a menudo son moléculas pequeñas hidrofóbicas, a anticuerpos monoclonales hidrofílicos, introduce inestabilidad adicional a los inmunocombinados. La formación de partículas en proteínas farmacéuticas, en particular, puede desestabilizar el compuesto farmacéutico, haciendo así que la formulación sea menos potente o incluso dañina para uso clínico. Por ejemplo, las partículas en las formulaciones farmacéuticas inyectadas pueden causar lesiones significativas en los pacientes. Además, la
40 formación de agregados es una de las principales vías de degradación de las proteínas farmacéuticas (Chari y col., Pharm Res. 20, 1325-1336 (2003)) y puede conducir a efectos indeseables, tales como inmunogenicidad. La inestabilidad química de los inmunocombinados puede dar como resultado la generación de fármacos citotóxicos libres, que puede conducir a efectos secundarios tóxicos.

Una formulación adecuada para un inmunocombinado previene la inestabilidad química y física durante un largo
45 período de tiempo. Se han descrito formulaciones líquidas o liofilizadas estables adecuadas para inmunocombinados que contienen maitansinoides, por ejemplo, en los documentos WO2004/004639, WO2004/110498 y WO2007/019232. El documento WO2007/019232 describe una formulación líquida de inmunocombinado que comprende varios excipientes, en el que la formulación es una solución acuosa tamponada. El documento WO2004/110498 proporciona un líquido y una composición liofilizada que comprende un anticuerpo acoplado
50 químicamente a un maitansinoide. El documento WO2004/004639 describe formulaciones adecuadas para el inmunocombinado huC242-DM1.

Sin embargo, el mensaje general de todas estas publicaciones es que cada inmunocombinado, aquí MF-T-SPDB-DM4, es una combinación especial de un anticuerpo, enlazador y un fármaco citotóxico. Esta combinación da como resultado ciertas propiedades fisicoquímicas que necesitan una solución impredecible para una formulación adecuada que se
55 proporciona en la presente invención.

Breve resumen de la invención

La invención proporciona una formulación/composición adecuada para aplicaciones terapéuticas que comprende una

formulación de inmunocombinado que comprende: a. 5 mg/ml de MF-T-SPDB-DM4, b. L-histidina 10 mM, c. Glicina 130 mM, d. 5 % de sacarosa y e. polisorbato 80 al 0,01 % en el que la composición tiene un pH de 5,5 cuando se reconstituye con agua.

- 5 La invención también proporciona una composición liofilizada que comprende una formulación de inmunocombinado que comprende: a. 5 mg/ml de MF-T-SPDB-DM4, b. L-histidina 10 mM, c. Glicina 130 mM, d. 5% de sacarosa, y e. Polisorbato 80 al 0,01% en el que la formulación tiene un pH de 5,5 cuando se reconstituye con agua. La solución reconstituida de esta composición liofilizada es adecuada para aplicaciones terapéuticas.

Descripción detallada de la invención

- 10 La presente invención se refiere a la formulación farmacéuticamente adecuada del inmunocombinado MF-T-SPDB-DM4, en el que la formulación comprende: a. 5 mg/ml de MF-T-SPDB-DM4, b. L-histidina 10 mM, c. Glicina 130 mM, d. 5 % de sacarosa y e. polisorbato 80 al 0,01 % en el que la composición tiene un pH de 5,5 cuando se reconstituye con agua. La invención también se refiere a la composición liofilizada que comprende una formulación de inmunocombinado que comprende: a. 5 mg/ml de MF-T-SPDB-DM4, b. L-histidina 10 mM, c. Glicina 130 mM, d. 5% de sacarosa, y e. Polisorbato 80 al 0,01% en el que la formulación tiene un pH de 5,5 cuando se reconstituye con agua.

15 El inmunocombinado MF-T-SPDB-DM4 es conocido en la técnica (documento WO2010/124797). MF-T-SPDB-DM4 es un inmunocombinado que comprende el anticuerpo MF-T acoplado químicamente a un maitansinoide (descrito en el documento WO2009/068204).

- 20 La degradación de inmunocombinados, aquí MF-T-SPDB-DM4, es un efecto no deseado para aplicaciones farmacéuticas. La eficacia o disponibilidad del fármaco puede cambiar espectacularmente. La degradación puede tener lugar debido a la inestabilidad química (que da como resultado una nueva entidad química) o inestabilidad física. La inestabilidad química puede ser el resultado de, por ejemplo, desamidación, hidrólisis, oxidación o intercambio de disulfuro. La inestabilidad física puede resultar de, por ejemplo, agregación o adsorción. La conjugación de fármacos, especialmente fármacos citotóxicos, que a menudo son hidrofóbicos, moléculas pequeñas, a anticuerpos monoclonales hidrofílicos, introduce inestabilidad adicional a los inmunocombinados. La formación de partículas en proteínas farmacéuticas, en particular, puede desestabilizar el compuesto farmacéutico, haciendo así que la formulación sea menos potente o incluso dañina para uso clínico. Por ejemplo, las partículas en las formulaciones farmacéuticas inyectadas pueden causar lesiones significativas en los pacientes. Además, la formación de agregados es una de las principales vías de degradación de las proteínas y puede provocar efectos indeseables, tales como inmunogenicidad.

30 Por lo tanto, un objetivo de la presente invención para proporcionar formulaciones farmacéuticamente adecuadas del inmunocombinado MF-T-SPDB-DM4 que impiden la formación de "agregados de alto peso molecular". La expresión "agregados de alto peso molecular" o "HMW", como se usa en el presente documento, se refiere a agregados que comprenden dos o más moléculas de inmunocombinados.

- 35 Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar formulaciones farmacéuticamente adecuadas del inmunocombinado MF-T-SPDB-DM4 que previenen la inestabilidad química. La inestabilidad química de los inmunocombinados puede dar lugar a la generación de fármacos citotóxicos libres (en este caso especies libres de maitansinoides DM4), que puede conducir a efectos secundarios tóxicos. Por lo tanto, además, debe minimizarse o evitarse la presencia o generación de cualquier tipo de fragmentos de "peso molecular bajo" (LMW).

- 40 La presente invención se basa en el descubrimiento de que se logró una composición que contenía MF-T-SPDB-DM4, que permite una vida útil prolongada como formulación líquida, así como la composición liofilizada. Esta formulación permite el almacenamiento a largo plazo como composición liofilizada (vida útil prolongada) y después de la reconstitución, la posibilidad de almacenar la porción no utilizada durante un largo período de tiempo como solución acuosa.

- 45 Una vida útil típica para las composiciones inmunocombinadas de la presente invención es de aproximadamente 1 a 5 años, preferentemente de 1 a 4 años, más preferentemente de 2 a 4 años, a 4 °C.

- Este tipo de formulaciones podría lograrse mediante la inclusión de excipientes que inhiban o reduzcan la agregación y la formación de partículas. Las formulaciones para estabilizar los inmunocombinados son conocidas en la técnica. Se han descrito formulaciones líquidas o liofilizadas estables adecuadas para inmunocombinados que contienen maitansinoides, por ejemplo, en los documentos WO2004/004639, WO2004/110498 y WO2007/019232. El documento WO2007/019232 describe una formulación de inmunocombinado líquido que comprende: un inmunocombinado y uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en: sacarosa, polisorbato 20, polisorbato 80, ciclodextrina, dextrosa, glicerol, polietilenglicol, manitol, cloruro de sodio y un aminoácido, en el que la formulación es una solución acuosa tamponada que tiene un pH de 4,5 a 7,6. El documento WO2004/110498 proporciona un líquido y una composición liofilizada que comprende un anticuerpo acoplado químicamente a un maitansinoide. El documento WO2004/004639 describe formulaciones adecuadas para el inmunocombinado huC242-DM1. Pero también es bien sabido que cada inmunocombinado, aquí MF-T-SPDB-DM4, es una combinación especial de un anticuerpo, enlazador y un fármaco citotóxico, que da como resultado problemas de formulación impredecibles.

La presente invención también se refiere a la administración de composiciones farmacéuticas. Dicha administración se consigue por vía oral o parenteral. Para los inmunoconjugados, se prefieren las vías de administración parenteral. Los procedimientos de administración parenteral incluyen administración tópica, intraarterial (directamente al tumor), intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, inyección intravenosa, intraperitoneal o intranasal. Además de los principios activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos adecuados farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y adyuvantes que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Se pueden encontrar más detalles sobre las técnicas de formulación y administración en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Ed. Maack Publishing Co, Easton, Pa.).

Las formulaciones de la invención pueden administrarse usando un inyector, una bomba, una jeringa o cualquier otro dispositivo conocido en la técnica, así como por gravedad. Se puede usar una aguja o un catéter para introducir las formulaciones de la presente invención en el cuerpo de un paciente a través de ciertas vías parenterales.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para alcanzar el fin previsto, es decir, el tratamiento de una enfermedad particular. La determinación de una dosis eficaz entra bien en de la capacidad de los expertos en la técnica.

Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente, ya sea en ensayos de cultivo celular, por ejemplo, células neoplásicas, o en modelos animales, generalmente ratones, conejos, perros, cerdos o monos. El modelo animal también se usa para alcanzar un intervalo de concentración deseado y vía de administración. Tal información se puede usar después para determinar dosis útiles y vías de administración en seres humanos.

Las composiciones de la presente invención están formuladas para ser aceptables en una aplicación terapéutica. "Aplicación terapéutica" se refiere a tratamientos que implican la administración a un sujeto que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz del inmunoconjugado MF-T-SPDB-DM4. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se define en el presente documento como la cantidad del inmunoconjugado MF-T-SPDB-DM4 que es de cantidad suficiente para reducir la proliferación de células positivas a mesotelina o para reducir el tamaño de un tumor que expresa mesotelina en un área tratada de un sujeto, ya sea como una dosis única o según un régimen de múltiples dosis, solo o junto con otros agentes, lo que conduce al alivio de una afección adversa, sin embargo, cuya cantidad es toxicológicamente tolerable. El sujeto puede ser un animal humano o no humano (por ejemplo, conejo, rata, ratón, perro, mono u otro primate de orden inferior).

El médico individual escoge la dosificación exacta según el paciente que va a tratar. La dosificación y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del resto activo o para mantener el efecto deseado. Los factores adicionales que pueden tenerse en cuenta incluyen la gravedad del estado de la enfermedad, por ejemplo, el tamaño y la localización del tumor; la edad, el peso y el sexo del paciente; la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración, la combinación o combinaciones de fármacos, las sensibilidades de reacción y la tolerancia/respuesta al tratamiento. Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada pueden administrarse, por ejemplo, cada 3 a 4 días, cada semana, una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas, dependiendo de la semivida y la tasa de aclaramiento de la formulación en particular.

La expresión "formulación farmacéutica" o "formulación" se refiere a una preparación que está en una forma tal que permite que la actividad biológica de un principio activo contenido en ella sea efectiva, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto para el cual se administraría la formulación.

La presente invención también proporciona un polvo liofilizado de la formulación líquida. "Liofilizado" significa que la composición se ha liofilizado al vacío. Durante la liofilización, la formulación líquida se congela y los solutos se separan del disolvente. El disolvente se elimina por sublimación (es decir, desecación primaria) y luego por desorción (es decir, desecación secundaria). La liofilización da como resultado una torta o polvo que puede almacenarse durante un largo período de tiempo. Antes de la administración, la composición liofilizada se reconstituye en un disolvente, preferentemente agua estéril para inyección. La expresión "formulación reconstituida", como se usa en el presente documento, se refiere a dicha composición liofilizada después de la solubilización.

Los procedimientos de liofilización son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Wang, W., Int. J. Pharm., 203, 1-60 (2000)). La composición liofilizada de la invención se logró con dos protocolos de liofilización diferentes como se describe en los ejemplos con detalle.

Para prevenir la degradación durante el proceso de liofilización, la composición líquida de la invención comprende un crioprotector. El término "crioprotector", como se usa en el presente documento, se refiere a un excipiente que protege a las moléculas inestables durante la congelación. La composición líquida previa a la liofilización comprende 5 % de sacarosa.

La composición liofilizada puede contener además un agente de carga, preferentemente un agente de carga cristalizable. Los agentes de carga típicamente se usan en la técnica para proporcionar estructura y peso a la "torta" producida como resultado de la liofilización. Cualquier agente de carga adecuado conocido en la técnica puede usarse

en relación con la composición liofilizada de la invención. Los agentes de carga adecuados incluyen, por ejemplo, manitol, dextrano y glicina.

La composición de la invención comprende un tensioactivo. El tensioactivo es polisorbato 80 a una concentración de 0,01 %.

- 5 El término "tampón", como se usa en el presente documento, se refiere a una solución tamponada, cuyo pH cambia solo marginalmente después de la adición de sustancias ácidas o básicas. El "sistema tampón" comprende L-histidina 10 mM y glicina 130 mM.

Una realización de la invención es una formulación de inmunoconjugado que comprende MF-T-SPDB-DM4 como se define en las reivindicaciones, en la que la composición tiene un pH de 5,5.

- 10 La invención es una formulación de inmunoconjugado que comprende 5 mg/ml de MF-T-SPDB-DM4, como se define en las reivindicaciones.

La invención es una formulación de inmunoconjugado que comprende MF-T-SPDB-DM4 y un sistema tampón que comprende L-histidina 10 mM y glicina 130 mM, como se define en las reivindicaciones.

- 15 La invención es una formulación de inmunoconjugado que comprende MF-T-SPDB-DM4, un sistema tampón y un crioprotector, que es 5 % de sacarosa en una composición líquida o la composición líquida antes de la liofilización, como se define en las reivindicaciones.

Una realización de la invención es una formulación de inmunoconjugado que comprende MF-T-SPDB-DM4, un sistema tampón, un crioprotector, como se define en las reivindicaciones y un tensioactivo que es polisorbato 80 al 0,01 %.

- 20 La invención es una formulación de inmunoconjugado que comprende 5 mg/ml de MF-T-SPDB-DM4, L-histidina 10 mM, glicina 130 mM, 5 % de sacarosa y polisorbato 80 al 0,01 %, a un pH de 5,5.

Una realización de la invención es una composición liofilizada obtenida por liofilización de la formulación de inmunoconjugado líquido de acuerdo con la presente invención u obtenible por liofilización de una formulación de inmunoconjugado líquido de acuerdo con la presente invención.

- 25 Una realización preferida de la invención es una composición liofilizada obtenida por liofilización de una formulación líquida de inmunoconjugado de acuerdo con la presente invención.

Una realización preferida de la invención es una composición liofilizada obtenida por liofilización de una formulación líquida de inmunoconjugado de acuerdo con la presente invención usando procedimientos explicados en el ejemplo 6.

- 30 Una realización altamente preferida de la invención es una composición liofilizada obtenida por liofilización de la formulación líquida de inmunoconjugado que comprende 5 mg/ml de MF-T-SPDB-DM4, L-histidina 10 mM, glicina 130 mM, 5 % de sacarosa y polisorbato 80 al 0,01 %, a un pH de 5,5 u obtenible por liofilización de la formulación líquida de inmunoconjugado que comprende 5 mg/ml de MF-T-SPDB-DM4, L-histidina 10 mM, glicina 130 mM, 5 % de sacarosa y polisorbato 80 al 0,01 % a un pH de 5,5.

- 35 Una realización de la presente invención es una formulación líquida de inmunoconjugado obtenida por reconstitución de una composición liofilizada de acuerdo con la presente invención (llamada formulación reconstituida). En una realización preferida de la presente invención, la composición liofilizada se reconstituye en agua, preferentemente en agua estéril para inyección.

- 40 Por lo tanto, de acuerdo con la invención, el contenido de una composición liofilizada que debe reconstituirse para contener 5 mg/ml de MF-T-SPDB-DM4 comprende 0,31 mg de L-histidina, 1,95 mg de glicina, 9,99 mg de sacarosa y 0,02 mg de polisorbato 80 por mg del inmunoconjugado MF-T-SPDB-DM4. Una vez reconstituido con agua, tal composición liofilizada tiene un pH de aproximadamente 5,5.

Si no se indica lo contrario, todos los valores en % en este caso son % en peso por volumen.

La presente invención se describe adicionalmente mediante los ejemplos siguientes, que son ilustrativos del proceso y no deben interpretarse como limitantes de la invención. El experto en la materia puede adoptar y adaptar los parámetros de proceso que se detallan a continuación para satisfacer las necesidades particulares.

45 **Ejemplo 1**

Este ejemplo muestra cómo se produjeron diferentes composiciones líquidas que contenían MF-T-SPDB-DM4. Estas composiciones se analizaron posteriormente como se describe en los siguientes ejemplos.

- 50 El inmunoconjugado MF-T-SPDB-DM4 se preparó como se describe en el documento WO2010/124797. Para estudiar varias composiciones de formulación, la solución que comprende el inmunoconjugado MF-T-SPDB-DM4 debe cambiarse de forma definida. Las soluciones que comprenden MF-T-SPDB-DM4 se inyectaron en una columna de

5 exclusión por tamaño preparativa rellena con Sephadex G25 conectada a un explorador ÄKTA (GE Healthcare). Las soluciones aplicadas se eluyeron con la solución tampón final de interés. El tamaño de la columna permitió un intercambio completo de tampones, de modo que la fracción de elución recogida consistió en MF-T-SPDB-DM4 en la solución tampón de interés. La concentración de proteína se ajustó mediante ultrafiltración utilizando una célula de Vivapore (10/20, 7500 MWCO; Sartorius).

Ejemplo 2

Este ejemplo (que no se encuentra dentro del alcance de las reivindicaciones) muestra el efecto de varios sistemas de tampón en la agregación evaluada por el aspecto visual, así como por la dispersión dinámica de la luz (DLS) y sobre la estabilidad del inmunoconjugado medida con calorimetría diferencial de barrido (DSC) para MF T-SPDB-DM4.

10 Los ingredientes del tampón y el pH tienen una fuerte influencia para inhibir o reducir la formación de partículas visibles y subvisibles. Las partículas visibles se pueden observar mediante inspección visual. La agregación subvisible es detectable a través de la dispersión dinámica de la luz (DLS).

Una temperatura de fusión T_m más alta medida con DSC es una fuerte indicación de una mayor estabilidad del inmunoconjugado.

15 El conjugado MF-T-SPDB-DM4 se formuló a aproximadamente 5,0 mg/ml en:

- (1) Fosfato de potasio 100 mM pH 7,5
- (2) L-histidina 10 mM, Glicina 130 mM pH 7,3
- (3) citrato de sodio 20 mM, 10 % de trehalosa pH 6,6
- (4) L-histidina 10 mM, Glicina 130 mM pH 5,5
- (5) 0,9 % de NaCl

Tabla 1: Influencia de varios sistemas tampón en el comportamiento de agregación y estabilidad

Composición	1	2	3	4	5
Tampón	KPi	His-Gly	Citrato	His-Gly	-
pH	7,5	7,3	6,6	5,5	-
Inspección visual	ok	ok	ok	ok	ok
DLS d_H [nm]	20	19	19	18	20
DSC T_{m1} [°C]	70,1	73,6	70,9	73,4	69,0

25 El sistema tampón tiene una fuerte influencia en la estabilidad del inmunoconjugado indicada por la temperatura de fusión T_{m1} , mientras que la formación y agregación de partículas no se vio afectada. Se prefieren para MF-T-SPDB-DM4 como se muestra en la Tabla 1, los sistemas tampón que contienen L-histidina y glicina que muestran una T_{m1} más alta de aproximadamente 3 °C.

Ejemplo 3

Este ejemplo (que no se encuentra dentro del alcance de las reivindicaciones) muestra el efecto de varios sistemas tampón en la agregación evaluada por el aspecto visual, por dispersión dinámica de la luz (DLS) y por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en los tres experimentos siguientes:

- 30 a. 48 horas de experimento de almacenamiento a 20 °C
- b. Test de estrés por agitación durante 24 horas a 20 °C
- c. Prueba de tensión de agitación invertida con contacto de tapón durante 24 horas a 20 °C

Estos experimentos intentan evaluar la estabilidad del inmunoconjugado en condiciones de tratamiento (almacenamiento) no óptimas.

35 El conjugado MF-T-SPDB-DM4 se formuló a aproximadamente 5,0 mg/ml en:

- (1) Fosfato de potasio 100 mM pH 7,5
- (2) L-histidina 10 mM, Glicina 130 mM pH 7,3
- (3) citrato de sodio 20 mM, 10 % de trehalosa pH 6,6
- (4) L-histidina 10 mM, Glicina 130 mM pH 5,5
- (5) 0,9 % de NaCl

Tabla 2: Influencia de varios sistemas tampón en el comportamiento de agregación en condiciones de tratamiento no óptimas.

Composición	1	2	3	4	5
Tampón	KPi	His-Gly	Citrato	His-Gly	-

pH		7,5	7,3	6,6	5,5	-
Prueba de almacenamiento a 48h/20 °C	visual	ok	ok	ok	ok	ok
	DLS d _H [nm]	22	20	14	16	16
	c _{Ab} [mg/ml]	5,7	3,9	4,9	4,5	5,0
	c _{Ab} [%]	102,5	102,7	102,5	99,8	99,2
	Relación DM4/Ab	2,9	2,9	2,9	2,7	2,9
	Monómero [%]	92,8	95,8	93,3	95,2	83,3
	LMW1 + 2 [%]	0,4	0,4	1,6	0,6	11,8
	Dímero HMW [%]	6,8	3,8	5,1	4,2	4,8
Prueba de agitación	visual	agregados	ok	ok	ok	ok
	DLS d _H [nm]	12	14	12	18	17
	cAb [mg/ml]	4,0	4,0	5,0	4,7	5,1
	cAb [%]	72,5	105,1	104,6	103,8	102,8
	Relación DM4/Ab	2,6	2,8	2,9	2,6	2,9
	Monómero [%]	-	95,5	93,3	95,1	83,0
	LMW 1 + 2 [%]	-	0,7	1,6	0,7	12,3
	Dímero HMW [%]	-	3,8	5,1	4,2	4,8
Agitación inv. (contacto de tapón)	visual	agregados	ok	ok	ok	ok
	DLS d _H [nm]	17	11	12	13	22
	cAb [mg/ml]	4,3	3,5	4,8	4,5	5,0
	cAb [%]	77,2	92,0	101,5	99,6	99,6
	Relación DM4/Ab	2,6	2,8	2,9	2,7	2,9
	Monómero [%]	-	95,7	93,0	95,0	82,7
	LMW1 + 2 [%]	-	0,6	1,6	0,5	12,3
	Dímero HMW [%]	-	3,8	5,4	4,1	5,0

Las condiciones tampón tienen un fuerte efecto en el comportamiento de agregación en condiciones de tratamiento (almacenamiento) no óptimas, lo cual no era obvio en el ejemplo 2. En el ejemplo 2 solo se pudo observar que los sistemas tampón que contienen L-histidina y glicina muestran una T_{m1} mayor que indica una mayor estabilidad del inmunoconjugado.

- 5 Como se muestra en la Tabla 2, la composición 1 y la composición 5 tienen un fuerte comportamiento para formar agregados. Para la composición 1, la tendencia a agregarse ya es obvia por inspección visual en la prueba de agitación, así como en el experimento de agitación invertida. Para la composición 5, los resultados de la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) muestran una disminución dramática del monómero inmunoconjugado que indica agregación. La composición 3 muestra un aumento de la formación de dímeros inmunoconjugados y, por lo tanto, revela la tendencia a la agregación.

15 Sorprendentemente, la composición 2 que contiene L-histidina y glicina a pH 7,3 muestra una pérdida de concentración de proteína en el experimento de agitación invertida (contacto de tapón). La relación de la concentración de proteínas antes y después del experimento de agitación (cAb [%]) es solo del 92 % en comparación con el 99,6 % a pH 5,5. Esta pérdida de proteína podría deberse a una mayor adsorción al tapón a un pH de 7,3 comparado con un pH de 5,5. Esto es aún más sorprendente, ya que no se pudo observar una disminución de la estabilidad del inmunoconjugado confirmada por la DSC y un mayor comportamiento de agregación.

Este experimento muestra que se prefieren las composiciones para MF-T-SPDB-DM4 que contienen L-histidina y glicina, y las composiciones para MF-T-SPDB-DM4 que contienen L-histidina y glicina a pH 5,5 son altamente preferidas.

20 **Ejemplo 4**

Este ejemplo muestra el efecto del polisorbato 80 en la agregación de proteínas evaluada por inspección visual y DLS.

El conjugado MF-T-SPDB-DM4 se formuló a aproximadamente 5,0 mg/ml en:
L-Histidina 10 mM, Glicina 130 mM pH 5,5, que contiene de 0,0 a 0,1 % de polisorbato 80 (solo 0,01 % que cae dentro del alcance de las reivindicaciones)

25

Tabla 3: Influencia del polisorbato 80 en la agregación de proteínas

Condiciones	polisorbato 80 [%]	Inspección visual	DLS d _H [nm]	Span ₂₅₋₇₅	C _{Ab} [mg/ml]
Sin agitación	0,000	transparente	8	0,41	5,09
	0,001	transparente	17	0,38	5,11
	0,005	transparente	15	0,45	5,09
	0,010	transparente	8	0,25	5,09
	0,100	transparente	17	0,37	4,61
Agitación INV. (contacto de tapón)	0,000	transparente	17	0,39	5,04
	0,001	transparente	16	0,45	5,19
	0,005	transparente	18	0,45	5,06
	0,010	transparente	19	0,33	4,93
	0,100	transparente	22	0,39	4,62

La adición de polisorbato 80 no tiene ningún efecto negativo en el sistema de soplado preferido hasta una concentración del 0,1 % (véase la Tabla 3). La adición de un detergente se favorece generalmente para evitar la adsorción incontrolada durante el almacenamiento y la aplicación. Se prefiere una concentración de polisorbato 80 de aproximadamente 0,01 %.

Ejemplo 5

Este ejemplo muestra la estabilidad de las formulaciones líquidas preferidas durante un período de 14 días. Además, se comprobaron dos concentraciones de sacarosa para evaluar la agregación de proteínas mediante inspección visual, DLS y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

La sacarosa es un muy potente y uno de los lioprotectores comúnmente utilizados. Para una formulación adecuada para el almacenamiento de líquidos, así como para la liofilización, se evaluó la influencia de la sacarosa en el inmunoconjugado MF-T-SPDB-DM4.

El conjugado MF-T-SPDB-DM4 se formuló a aproximadamente 5,0 mg/ml en:

- (1) 10 % de sacarosa, polisorbato 80 al 0,01 %, L-histidina 10 mM, glicina 130 mM pH 5,5 (no de acuerdo con la invención)
- (2) 5 % de sacarosa, polisorbato 80 al 0,01 %, L-histidina 10 mM, Glicina 130 mM pH 5,5

Tabla 4: Influencia de la sacarosa en la agregación de proteínas

Composición		Tiempo [d]	Temperatura de almacenamiento	Inspección visual	DLS d _H [nm]	C _{Ab} [mg/ml]	SEC HMW [% área]	Monómero SEC [% área]	SEC LMW [% área]
1	10 % de sacarosa	inicio	-	transparente	15	4,99	4,32	95,64	0,04
		14	2 - 8 °C	transparente	22,5	4,93	4,28	95,45	0,27
		14	25 °C	transparente	20,2	4,98	3,79	95,80	0,40
		14	40 °C	transparente	17,7	5,05	6,12	93,1	0,78
2	5 % de sacarosa	inicio	-	transparente	19	4,93	3,6	96,4	0,0
		14	2 - 8 °C	transparente	20	5,2	3,7	96,1	0,2
		14	25 °C	transparente	22	5,33	3,9	95,7	0,4
		14	40 °C	transparente	19	5,25	5,3	93,8	0,9

Durante un período de 14 días, las composiciones que contienen el inmunoconjugado MF-T-SPDB-DM4 son estables. Estas son composiciones adecuadas para la liofilización como se muestra en el ejemplo 6 y el ejemplo 8. No se pudo observar agregación por inspección visual, DLS y SEC. El contenido de monómero es muy estable. Incluso a temperaturas elevadas de 40 °C, la formulación líquida no muestra agregación durante un período de 14 días.

Las composiciones que contienen del 5 al 10 % de sacarosa son formulaciones preferidas. Las composiciones que contienen 5 % de sacarosa son altamente preferidas debido a una menor tonicidad.

Este experimento también muestra que una solución reconstituida después de la liofilización se puede almacenar durante un largo período de tiempo sin agregación.

Ejemplo 6

Este ejemplo muestra la robustez de la liofilización y la idoneidad de la composición líquida para la liofilización. Además, los resultados logrados después de la reconstitución de las muestras liofilizadas muestran claramente que la composición además permite una formulación liofilizada.

El conjugado MF-T-SPDB-DM4 se formuló a 5,0 mg/ml en la realización altamente preferida:

ES 2 735 645 T3

L-Histidina 10 mM, glicina 130 mM, 5 % de sacarosa, polisorbato 80 al 0,01 %, pH 5,5

Se han utilizado dos procedimientos de liofilización: condiciones 1: un procedimiento bastante duro que toma en total aproximadamente 62,5 horas; condiciones 2: un procedimiento más suave que toma en total aproximadamente 95,5 horas. Los detalles de los ciclos de liofilización se han resumido en la Tabla 5.

5 **Tabla 5:** Parámetros de los ciclos de liofilización utilizados

	Condiciones 1			Condiciones 2		
	Tiempo [hh:mm]	Temp. [° C]	Presión [mbar]	Tiempo [hh:mm]	Temp. [° C]	Presión [mbar]
Carga	00:01	5,0		00:01	20,0	
Congelación	2:00	-50,0		0:30	-5,0	
Congelación				1:00	-5,0	
Congelación				1:00	-45,0	
Congelación				3:30	-45,0	
Evacuación	0:30	-50,0	0,130	0:30	-45,0	0,100
Desecación prim.	2:00	-50,0	0,130	00:01	-45,0	0,100
Desecación prim.	0:30	-50,0	0,066	1:00	-10,0	0,100
Desecación prim.	2:00	0	0,066	75:00	-10,0	0,100
Desecación prim.	16:40	0	0,066			
Desecación prim.	1:30	0	0,053			
Desecación sec.	3:00	30,0	0,053	1:00	40,0	0,050
Desecación sec.	36:40	30,0	0,053	12:00	40,0	0,050
Sumario	Carga	00:01		00:01		
	Congelación	02:00		6:30		
	Desecación principal	20:40		76:01		
	Desecación secundaria	39:40		13:00		
	Total	62:21		95:32		

10 Los procedimientos de liofilización descritos anteriormente dan como resultado una torta blanca o polvo, que puede reconstituirse rápidamente (aproximadamente 1 min) en agua. Si se reconstituye a la misma concentración de proteína que antes de la liofilización (5 mg/ml), se observó una solución transparente sin partículas. No se detectaron agregaciones ni indicios de agregación (consulte la Tabla 6). El contenido de monómero de SEC está en el mismo intervalo que sin liofilización (consulte la Tabla 4 para comparación).

El análisis en profundidad de la solución reconstituida incluyó la detección de partículas no visibles a través del procedimiento HIAC, además, se implementó el procedimiento más sensible de MFI (imágenes de microflujo). Las partículas/contenedor (volumen 12,5 ml) están dentro de los criterios generalmente aceptados. Este es un requisito importante para la idoneidad como producto farmacéutico.

15 En la tabla 6 se resumen las propiedades de las muestras después de la reconstitución con agua para inyección.

Tabla 6: Caracterización de lotes liofilizados después de la reconstitución con agua [volumen final 12,5 ml/contenedor]

Lote	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Liofilización	Condiciones 1	Condiciones 2	Condiciones 2
Tiempo de reconstitución	62 s	41 s	33 s
Inspección visual	transparente	transparente	transparente
SEC, Monómero [% área]	92,4	92,2	91,8
SEC, LMW, [% área]	1,0	1,4	1,4
pH	5,5	5,7	5,7
Concentración de proteína	5,0 mg/ml	5,0 mg/ml	4,9 mg/ml
	partículas/contenedor	partículas/contenedor	partículas/contenedor
Partículas no visibles procedimiento HIAC $\geq 2 \mu\text{m}$	1812	734	520

(continuación)

Lote	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Partículas no visibles. procedimiento HIAC. $\geq 5 \mu\text{m}$	340	173	115
Partículas no visibles. procedimiento HIAC. $\geq 10 \mu\text{m}$	90	38	38
Partículas no visibles. procedimiento HIAC. $\geq 50 \mu\text{m}$	9	4	1
Partículas no visibles. procedimiento de MFI $\geq 2 \mu\text{m}$	3185	2137	2258
Partículas no visibles. procedimiento de MFI $\geq 5 \mu\text{m}$	540	192	359
Partículas no visibles. procedimiento de MFI $\geq 10 \mu\text{m}$	148	55	71
Partículas no visibles. procedimiento de MFI $\geq 25 \mu\text{m}$	28	9	0

Ejemplo 7

Este ejemplo muestra la estabilidad química del inmunoc conjugado MF-T-SPDB-DM4 en varias formulaciones líquidas preferidas durante un período de 14 días. Se utilizaron dos concentraciones de sacarosa diferentes.

5 El conjugado MF-T-SPDB-DM4 se formuló a aproximadamente 5,0 mg/ml en:

- (1) 10 % de sacarosa, polisorbato 80 al 0,01 %, L-histidina 10 mM, glicina 130 mM pH 5,5 (no de acuerdo con la invención)
- (2) 5 % de sacarosa, polisorbato 80 al 0,01 %, L-histidina 10 mM, Glicina 130 mM pH 5,5

10 MF-T-SPDB-DM4 es estable en diferentes condiciones de almacenamiento durante un período de tiempo de 14 días (consulte la Tabla 7). Incluso a temperaturas elevadas de 25 ° C o 40 ° C solo pequeñas cantidades de especies libres de toxóforos (DM4-enlazador libre, DM4 libre) son detectables. Así que las composiciones preferidas son tanto física como químicamente estables

Tabla 7: Estabilidad química del inmunoc conjugado MF-T-SPDB-DM4 (composición 1 no según la invención)

Composición		Tiempo [d]	Temperatura de almacenamiento	Inspección visual	C _{Ab} [mg/ml]	Relación DM4/Ab	DM4-enlazador [$\mu\text{g/ml}$]	DM4 libre [$\mu\text{g/ml}$]
1	10 % de sacarosa	inicio	-	transparente	4,99	2,7	-	-
		14	2 - 8 °C	transparente	4,93	2,7	0,003	<0,002
		14	25 °C	transparente	4,98	2,7	0,106	<0,002
		14	40 °C	transparente	5,05	2,4	0,349	0,004
2	5 % de sacarosa	inicio	-	transparente	4,93	2,4	-	-
		14	2 - 8 °C	transparente	5,2	2,8	0,021	0,002
		14	25 °C	transparente	5,33	2,7	0,110	0,002
		14	40 °C	transparente	5,25	2,5	0,313	0,004

Ejemplo 8

15 Este ejemplo muestra la estabilidad a largo plazo del inmunoc conjugado MF-T-SPDB-DM4 en una composición liofilizada preferida.

20 El conjugado MF-T-SPDB-DM4 se formuló a aproximadamente 5,0 mg/ml en L-histidina 10 mM, glicina 130 mM, 5 % de sacarosa, polisorbato 80 al 0,01 %, pH 5,5. La formulación líquida se liofilizó como se describe en el ejemplo 6. La composición liofilizada que debe reconstituirse para contener 5 mg/ml de MF-T-SPDB-DM4 comprende, por lo tanto, 0,31 mg de L-histidina, 1,95 mg de glicina, 9,99 mg de sacarosa y 0,02 mg de polisorbato 80 por mg del inmunoc conjugado MF-T-SPDB-DM4. Una vez reconstituido con agua, tal composición liofilizada tiene un pH de aproximadamente 5,5.

La composición liofilizada se almacenó durante un período de tiempo de 24 meses a una temperatura de 2 a 8 °C. En ciertos momentos (3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses) las muestras se reconstituyeron con agua estéril.

25 Después de la reconstitución (volumen final 12,5 ml/vial), la composición líquida se analizó para determinar su utilidad en aplicaciones farmacéuticas. Además de los ensayos descritos anteriormente que analizan la estabilidad física (agregación, formación de partículas, etc.) y estabilidad química (especies de DM4 libre; relación DM4/anticuerpo) también se analizó la potencia como inmunoc conjugado en un ensayo biológico basado en células.

Como se muestra en la tabla 8, todos los parámetros relevantes son estables durante un período de 24 meses. Todos los parámetros medidos, incluida la potencia biológica del inmunoc conjugado, muestran que las formulaciones preferidas permiten una vida útil prolongada.

5 **Tabla 8:** Estabilidad a largo plazo (hasta 24 meses) del inmunoc conjugado MF-T-SPDB-DM4 en la formulación liofilizada preferida. Resultados de la prueba después de la reconstitución con agua estéril.

Ensayo	Tiempo de almacenamiento (meses)						
	0	3	6	9	12	18	24
Tiempo de reconstitución [s]	28	40	39	56	48	46	40
Conc. proteica [mg/ml]	4,8	5,2	4,9	4,9	4,9	5,0	4,8
valor de pH	5,6	5,5	5,6	5,5	5,6	5,5	5,7
Partículas visibles	libre	libre	libre	libre	libre	libre	libre
HIAC, partículas >= 25 µm por vial	5	-	-	-	0	-	21
HIAC, partículas >= 10 µm por vial	21	-	-	-	15	-	9
Monómero SEC-HPLC [%]	92,1	91,6	92,1	92,6	92,4	90,5	90,9
LMW SEC-HPLC [%]	n.d.	n.d.	n.d.	0,3	0,3	2,2	1,3
Especies de DM4 libre [µg/mg]	0,17	0,17	0,19	0,18	0,20	0,18	0,15
Relación DM4/Ab	3,0	3,1	3,1	3,0	3,1	3,1	3,2
Potencia (bioensayo basado en células) [%]	55	66	51	69	57	76	50

PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS

Determinación de las concentraciones de proteínas y determinación de la relación maitansinoide/anticuerpo (relación DM4/Ab)

10 Las concentraciones de proteína y la relación maitansinoide/anticuerpo (relación DM4/Ab) se determinaron mediante la medición de la absorción a dos longitudes de onda (280 nm y 252 nm) utilizando un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Cada solución se midió dos veces en tres muestras independientes.

Las muestras se diluyeron con tampón de formulación para obtener una absorción de UV a 280 nm en el intervalo de 0,6 a 1,2. La muestra se midió a 252 nm y 280 nm utilizando el tampón de formulación como blanco. Los cálculos se muestran a continuación.

15 **Cálculos:**

$$\text{Concentración de DM4 [M]} \quad [DM4] = \frac{[(A_{252} \times DF) - (A_{280} \times DF \times AB_{\epsilon_{252}/\epsilon_{280}})]}{[5323 \times (4,89 - AB_{\epsilon_{252}/\epsilon_{280}})]}$$

- A₂₅₂ = Extinción 252 nm
- DF = factor de dilución
- A₂₈₀ = Extinción 280 nm
- AB_{ε₂₅₂/ε₂₈₀} = Relación de coeficientes de extinción del anticuerpo 0,35
- AB_{ε₂₅₂} = 68614 [M⁻¹ (cm)⁻¹]
- AB_{ε₂₈₀} = 195413 [M⁻¹ (cm)⁻¹]
- DM4_{ε₂₈₀} = 5323 [M⁻¹ (cm)⁻¹]
- DM4_{ε₂₅₂} = 26010 [M⁻¹ (cm)⁻¹]
- DM4_{ε₂₅₂/ε₂₈₀} = Relación de coeficientes de extinción de DM4 (4,89)

$$\text{Concentración de anticuerpo [M]} \quad [AB] = \frac{[(A_{280} \times DF) - (5323 \times [conc. de DM4])]}{AB_{\epsilon_{280}}}$$

- DM4_{ε₂₈₀} = 5323 [M⁻¹ (cm)⁻¹]
- AB_{ε₂₈₀} = 195413 [M⁻¹ (cm)⁻¹]

$$\text{La relación DM4/AB} = \frac{[DM4]}{[AB]}$$

$$\text{La concentración de anticuerpo [mg/ml]} = [\text{AB}] \times \text{MW}_{\text{AB}}$$

[AB] = Concentración molar de anticuerpo

MW_{AB} = 146278 g/mol

Inspección visual

5 Para el aspecto visual, las soluciones de prueba que contenían MF-T-SPDB-DM4 se inspeccionaron utilizando un fondo oscuro en busca de partículas o turbidez. Una solución clara después del intercambio de tampón o las pruebas de estrés es un signo de menor presencia o ausencia de formación de dímeros y/o oligómeros, mientras que una turbidez visible de la solución se correlaciona con un alto contenido de dímeros y oligómeros.

Dispersión de luz dinámica (DLS)

10 La dispersión dinámica de la luz es un procedimiento para analizar la luz dispersada generada por un láser. La luz dispersada por una sonda solubilizada o suspendida puede usarse para calcular el radio hidrodinámico (d_H [nm]). Un radio hidrodinámico en aumento es una indicación de la agregación del inmunoconjugado. El radio hidrodinámico a través de DLS se determinó utilizando un Horiba LB 550 (Retsch Technology). Un d_H medido superior a 25 nm se observó como crítico. Los valores de d_H entre 16 nm y 25 nm indicaron un inmunoconjugado de buen comportamiento.

Calorimetría diferencial de barrido, (DSC)

15 La estabilidad de la proteína se puede medir a través de la determinación de la temperatura de fusión. Con la calorimetría de barrido diferencial (DSC) se midió la temperatura de fusión (T_m) de MF-T-SPDB-DM4 en varias soluciones. Las muestras se calentaron de 20 °C a 105 °C y la temperatura de fusión (T_m) se determinó utilizando un calorímetro VP-DSC (GE Healthcare).

Prueba de estrés en agitación

20 Los inmunoconjugados como MF-T-SPDB-DM4 son muy sensibles a la agitación mecánica, que tienen lugar durante la producción, carga o transporte. A una cierta intensidad de movimiento, los inmunoconjugados comienzan a agregarse y desnaturalizarse. Durante el ensayo de estrés por agitación, las composiciones líquidas que contenían MF-T-SPDB-DM4 se analizaron para determinar la agregación y desnaturalización en condiciones controladas.

25 Las muestras que contenían MF-T-SPDB-DM4 se sometieron a estrés en un agitador de laboratorio (IKA, HS 260) en una cámara de temperatura controlada (MMM, FrioCell 200). La agregación de parámetros de calidad crítica (mediante inspección visual y DLS) se midió después de 24 horas a 20 °C y 300 rpm.

Cromatografía de exclusión por tamaño, SEC

30 Para la determinación de los contenidos de monómeros y dímeros, así como de los fragmentos de bajo peso molecular (LMW) y los contenidos de alto peso molecular (HMW), se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) utilizando un sistema de HPLC. MF-T-SPDB-DM4 se detectó utilizando un detector de fluorescencia y se cuantificó utilizando el procedimiento de porcentaje de área. Se utilizaron columnas estándar de HPLC SEC para proteínas, por ejemplo, Tosoh Biosep TSK gel G3000 SWXL 5 μm , 300 mm, Longitud x 7,8 mm de D. I.

Detección de partículas no visibles HIAC y MFI

35 Para la detección y recuento de partículas no visibles se aplicaron los procedimientos HIAC y MFI. Para las mediciones MFI (Micro Flow Imaging) se utilizó un sistema Micro-Flow Imaging™ DPA 4200 (Brightwell Technologies Inc.) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las mediciones de HIAC se realizaron utilizando un contador de partículas de líquido HIAC 9703+ (HACH Lange) en combinación con un sensor HRLD-150 13-150 μm de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Detección de maitansinoide libre con HPLC

40 El maitansinoide libre se determinó utilizando un procedimiento de HPLC. Se usó un Supelcosil LC-HISEP, 50 mm x 4,6 mm, 5 μm (Sigma-Aldrich) o una columna equivalente en combinación con un Zorbax Eclipse XDB-C18, 50 mm x 2,1 mm, 3,5 μm (Agilent) o una columna equivalente. Las columnas se utilizaron con un sistema de HPLC Agilent. El maitansinoide libre se separó de la proteína mediante cromatografía HISEP y posteriormente se cuantificó mediante cromatografía de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC). Las columnas se utilizaron a 35 °C. Como disolventes se utilizaron una fase móvil A (0,1 % de TFA en agua) y una fase móvil B (0,08 % de TFA en acetonitrilo). El maitansinoide (DM4) y el contenido de todos los demás componentes se calcula mediante el cálculo Empower. de rutina utilizando análisis de regresión lineal de la curva de calibración de hidrato de rutina en $\mu\text{g/ml}$. Para corregir los diferentes factores de correlación del hidrato de rutina y DM4, los resultados de DM4 y todos los demás componentes deben multiplicarse por el factor 1,05497.

45

Ensayo de potencia basado en células (bioensayo)

5 La actividad biológica del inmunoc conjugado MF-T-SPDB-DM4 se probó utilizando un ensayo de potencia basado en células como se describe en el documento WO2010/124797 en detalle. En resumen, las células HT29 transfectadas con mesotelina se sembraron en placas de 96 pocillos y se incubaron con una dilución en serie de MF-T-SPDB-DM4 durante 4 horas. Después de esta incubación con el inmunoc conjugado, las células se lavaron cuidadosamente con medio y se incubaron durante 68 a 96 horas adicionales. Después de este tiempo, la proliferación celular se cuantificó utilizando un procedimiento estándar (por ejemplo, el reactivo de Proliferación Celular WST-1, Roche). La relación de actividad en comparación con un valor estándar se evalúa y se informa.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de inmunoconjugado que comprende:

- 5
- a. 5 mg/ml de MF-T-SPDB-DM4, un inmunoconjugado anti-mesotelina de un maitansinoide,
 - b. L-histidina 10 mM,
 - c. Glicina 130 mM
 - d. 5 % (p/v) de sacarosa, y
 - e. 0,01 % (p/v) de polisorbato 80

en el que la formulación es una solución acuosa tamponada que tiene un pH de 5,5.

10 2. Una composición liofilizada obtenida por liofilización de una formulación líquida de inmunoconjugado según la reivindicación 1.

3. Una formulación de inmunoconjugado obtenida por reconstitución de la composición liofilizada de la reivindicación 2 en solución.

4. Una formulación de inmunoconjugado obtenida por reconstitución de la composición liofilizada de la reivindicación 2 en agua.

15 5. La composición liofilizada de la reivindicación 2, que debe reconstituirse para contener 5 mg/ml de MF-T-SPDB-DM4, comprende 0,31 mg de L-histidina, 1,95 mg de glicina, 9,99 mg de sacarosa y 0,02 mg de polisorbato 80 por mg del inmunoconjugado MF-T-SPDB-DM4. Una vez reconstituida con agua, tal composición liofilizada tiene un pH de aproximadamente 5,5.

20 6. Una formulación de inmunoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en una aplicación terapéutica.