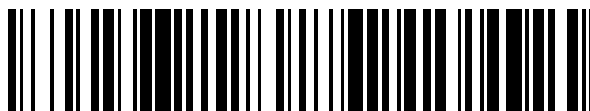


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 103**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2013** **PCT/EP2013/077166**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014** **WO14096051**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2013** **E 13808043 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019** **EP 2934582**

54 Título: **Formulación de anticuerpos anti HER2**

30 Prioridad:

21.12.2012 US 201261745293 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.07.2020

73 Titular/es:

ICHNOS SCIENCES SA (100.0%)

**Chemin de la Combeta 5
2300 La Chaux-de-Fonds, CH**

72 Inventor/es:

**ALBANESE, JONATHAN ANDRÉ;
GIOVANNINI, ROBERTO PIER-LORENZO y
O'MAHONY, KEVIN NIALL**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 773 103 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulación de anticuerpos anti HER2

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-HER2. Preferentemente, la formulación farmacéutica comprende una formulación de anticuerpo anti-HER2 liofilizada. Más preferentemente, la formulación comprende una formulación liofilizada de un anticuerpo anti-HER2 estable reconstituido con un diluyente para generar una formulación reconstituida estable.

Antecedentes de la invención

La familia de receptores ErbB está compuesta por cuatro receptores tirosina quinasas unidos a la membrana plasmática: EGFR/ErbB-1, HER2/ErbB-2, HER3/ErbB-3 y HER4/ErbB-4. Tanto los homo- como los heterodímeros se forman por los cuatro miembros de la familia EGFR, siendo HER2 el compañero de dimerización preferente y más potente para otros receptores ErbB (Graus-Porta D y otros, (1997) *Embo J*, 16: 1647- 1655; Tao RH y otros, (2008) *J Cell Sci*, 121: 3207-3217). Los cuatro receptores contienen un dominio extracelular de unión a ligando, un dominio transmembrana y un dominio intracelular que puede interactuar con una multitud de moléculas de señalización y exhibir actividad tanto dependiente de ligando como independiente de ligando. HER2 (Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2) también conocido como Neu, ErbB-2, CD340 (grupo de diferenciación 340) o p185 es una proteína que en los seres humanos es codificada por el gen *ERBB2*. La activación de HER2 conduce a la fosforilación del receptor, que desencadena una cascada de señales río abajo a través de múltiples vías de señalización, como MAPK, fosfoinositol 3-quinasa/AKT, JAK/STAT y PKC, lo que finalmente resulta en la regulación de múltiples funciones celulares, como el crecimiento, supervivencia y diferenciación (Huang Z y otros, (2009) *Expert Opin Biol Ther*, 9: 97-110). Se demostró que la sobreexpresión de este gen juega un papel importante en la patogénesis y progresión de ciertos tipos agresivos de cáncer de mama.

La amplificación o sobreexpresión del gen *ERBB2* ocurre en aproximadamente el 30 % de los cánceres de mama. Está fuertemente asociado con un aumento de la recurrencia de la enfermedad y un peor pronóstico (Roy V y Pérez EA (2009) *Oncologist*, 14 (11): 1061-9). La sobreexpresión también se asocia con otros tipos de cáncer en seres humanos, que incluyen: cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de esófago, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y formas agresivas de cáncer uterino, como el carcinoma endometrial seroso uterino (García de Palazzo I y otros, (1993) *Int J Biol Markers*, 8: 233-239; Ross JS y otros, (2003) *Oncólogo*, 8: 307-325; Osman I y otros, (2005) *J Urol*, 174: 2174-2177; Kapitanovic S y otros, (1997) *Gastroenterology*, 112: 1103-1113; Turken O y otros, (2003) *Neoplasma*, 50: 257-261; Oshima CT y otros, (2001) *Int J Biol Markers*, 16: 250-254; Santin AD y otros (2008) *Int J Gynaecol Obstet*, 102 (2): 128-31)

Los medicamentos conocidos dirigidos a HER2 incluyen el anticuerpo monoclonal trastuzumab (Herceptin®), que es efectivo en los cánceres que sobreexpresan HER2. Otro anticuerpo monoclonal pertuzumab (Perjeta®/Omnitarg™) inhibe la dimerización de los receptores HER2 y HER3. Se han propuesto diferentes formulaciones para estabilizar estos anticuerpos anti-HER2. WO2003062375 informa una formulación para estabilizar el trastuzumab mediante el uso de glicina. En WO2011012637, se informó una formulación líquida para inyección subcutánea de anticuerpos anti-HER2, que incluye Trastuzumab y Pertuzumab. WO2006044908 describe una formulación líquida tamponada con acetato de histidina que comprende Pertuzumab; mientras en WO1997004801 se propone una formulación estable de proteína liofilizada, tamponada con histidina o succinato, para proteínas que incluyen el anticuerpo anti-HER2.

El problema a resolver por la presente invención es proporcionar una formulación para estabilizar el anticuerpo anti-HER2 en una formulación líquida que pueda usarse como base para el desarrollo de formulaciones liofilizadas y reconstituidas.

Sumario de la invención

De acuerdo con la invención, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo que reconoce y se une al HER2 humano y que tiene una cadena pesada de SEQ ID NO: 10 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 11; un tampón de acetato, en el que el tampón de acetato es un tampón de acetato de sodio presente dentro de la formulación farmacéutica en una cantidad de entre 1 y 10 mM; un tensioactivo, en el que el tensioactivo es Polisorbato 80, presente dentro de dicha formulación farmacéutica en una cantidad entre 0,001 % y 0,1 % (p/p); un lioprotector, en el que el lioprotector es sacarosa presente en la formulación farmacéutica en una cantidad entre 5 % y 15 % (p/p) o sacarosa y manitol presente en la formulación farmacéutica en una cantidad de 5 % y 15 % (p/p) y entre 0,5 % y 5 % (p/p); y un agente de carga, en el que el agente de carga es glicina presente dentro de la formulación farmacéutica en una cantidad de entre 0,5 % y 1,5 % (p/p).

Por lo tanto, la invención también se refiere a una formulación liofilizada que comprende un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo, un lioprotector, un agente de carga, un tensioactivo y un tampón de acetato, en el que el pH de la formulación es pH 5,0-6,0, y su formulación reconstituida.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los resultados de un estudio de estabilidad acelerada de un anticuerpo anti-HER2 a 37°C. El anticuerpo anti-HER2 se formuló con varios excipientes que se verificaron debido a su potencial para estabilizar el anticuerpo en forma líquida. Los principales resultados porcentuales máximos de HP-CEX se muestran en la Figura 1a, el porcentaje de monómeros por HP-SEC en la Figura 1b, el porcentaje de agregación en la Figura 1c y el porcentaje de pérdida de concentración de anticuerpos anti-HER2 en la Figura 1d.

La Figura 2 muestra los resultados de un estudio de estabilidad acelerada de un anticuerpo anti-HER2 a 37°C, en una formulación líquida. Se formularon diferentes concentraciones del anticuerpo anti-HER2 a valores de pH en el intervalo de pH 4,0 a pH 6,0 y con diferentes tampones, ya sea citrato o acetato. El pico principal por los resultados de HP-CEX se muestra en la Figura 2a, el porcentaje de monómeros por HP-SEC en la Figura 2b, el porcentaje de agregación en la Figura 2c, el porcentaje de fragmentación en la Figura 2d y el porcentaje de pérdida de anticuerpos anti-HER2 concentración en la Figura 2e.

La Figura 3 muestra los resultados de un cribado para evaluar los intervalos óptimos de concentración de sal, tipo de tampón y antioxidante para la formulación líquida de anticuerpo anti-HER2 mantenida durante un mes a 37°C. La Figura 3a muestra la agregación y fragmentación a diversas concentraciones de NaCl a pH 5,5. El eje y muestra el porcentaje de agregación o fragmentación. La agregación se muestra en las barras de color gris claro, a la izquierda y la fragmentación se muestra en las barras de color gris oscuro, a la derecha; para cada concentración de NaCl. La Figura 3b muestra la desamidación del anticuerpo anti-HER2 a diversas concentraciones de NaCl a pH 5,5. La Figura 3c muestra el porcentaje de agregación y fragmentación del anticuerpo anti-HER2 cuando se formula con citrato o acetato a diversas concentraciones a pH 5,5. La agregación se muestra en las barras de color gris claro, a la izquierda y la fragmentación se muestra en las barras de color gris oscuro, a la derecha; para cada concentración de citrato o acetato.

La Figura 4 muestra el porcentaje de monómeros presentes en las 22 formulaciones ensayadas (véase la Tabla 8 para más detalles) en el tiempo 0 (barras de color claro; lado izquierdo) y después de cinco ciclos de congelación-descongelación (barras de color oscuro; lado derecho). Cada formulación ensayada se muestra en el eje x con el porcentaje de monómero que se muestra en el eje y. Las formulaciones 6, 8, 10 y 19 se seleccionaron para un trabajo experimental adicional.

La Figura 5 muestra el porcentaje de monómeros presentes en las cuatro formulaciones ensayadas después de la reconstitución de los pasteles. Todas las cantidades se muestran como % de monómeros para las formulaciones 6, 8, 10 y 19 seleccionadas del cribado anterior. La columna en el extremo derecho es un control en el tiempo 0.

La Figura 6 muestra el porcentaje de monómeros presentes en las 12 formulaciones ensayadas (véase la Tabla 11 para más detalles) en el tiempo 0 (barras de color claro; lado izquierdo) y después de cinco ciclos de congelación-descongelación (barras de color oscuro; lado derecho). Cada formulación ensayada se muestra en el eje x con el porcentaje de monómero que se muestra en el eje y. Las formulaciones 1, 4, 7, 10 y 11 se seleccionaron para la liofilización.

La Figura 7 muestra el porcentaje de monómeros presentes en 18 formulaciones ensayadas (véase la Tabla 12 para más detalles) en el tiempo 0 (barras de color claro; lado izquierdo) y después de la liofilización y la cromatografía líquida de alta presión - exclusión de tamaño (barras de color oscuro; lado derecho). Cada formulación ensayada se muestra en el eje x con el porcentaje de monómero que se muestra en el eje y.

La Figura 8 muestra los resultados de estabilidad para siete formulaciones liofilizadas ensayadas (véase la Tabla 13 para más detalles) en un estudio de estabilidad de un mes a 40°C. La Figura 8a muestra el porcentaje de monómeros presentes en las formulaciones ensayadas en el momento 0 (barras blancas; lado izquierdo), después de la liofilización (barras de color claro; centro) y después de un mes a 40°C (barras de color oscuro; lado derecho). Cada formulación ensayada se muestra en el eje x con el porcentaje de monómero que se muestra en el eje y. La Figura 8b muestra el % del pico principal después de la cromatografía de intercambio catiónico para las formulaciones ensayadas en el tiempo 0 (barras blancas; lado izquierdo), después de la liofilización (barras de color claro; centro) y después de un mes a 40°C (barras de color oscuro; lado derecho). La línea que conecta las columnas indica el porcentaje de pérdida del pico principal para cada formulación después de un mes de almacenamiento a 40°C. La Figura 8c muestra el porcentaje de humedad presente para cada formulación, ensayada después de la liofilización (barras de color claro; lado izquierdo) y después del almacenamiento durante un mes a 40°C (barras de color oscuro; lado derecho).

La Figura 9 muestra los resultados de estabilidad para las Formulaciones 1 y 2 (véase la Tabla 16 para detalles) en un estudio de estabilidad acelerado para los períodos de tiempo 0 (formulaciones líquidas y liofilizadas; barras claras y grises claras respectivamente), un mes a 40°C (barras grises oscuras) y dos meses a 40°C (barras negras). La Figura 9a muestra el porcentaje de monómeros (eje y) presente en las Formulaciones 1 y 2, medido por HPLC-SEC y la Figura 9b muestra el porcentaje de pico principal HPLC-CEX (eje y) para las Formulaciones 1 y 2.

La Figura 10 muestra los resultados de estabilidad para la formulación de anticuerpo anti-HER2 liofilizado en un estudio de estabilidad a largo plazo para los períodos de tiempo indicados en el eje x. La Figura 10a muestra el porcentaje de monómero (eje y) presente en la formulación medido por HPLC-SEC en los períodos de tiempo de 1, 2, 3, 6, 9 y 12 meses. La Figura 10b muestra el porcentaje principal de HPLC-CEX (eje y) para la formulación en los períodos de 1, 2, 3, 6, 9 y 12 meses.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se refiere a una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo que reconoce y se une al HER2 humano.

El término "HER2 humano" como se usa en la presente incluye variantes, isoformas y homólogos de especies de HER2 humano. En consecuencia, los anticuerpos de la invención pueden, en ciertos casos, reaccionar de forma cruzada con HER2 de especies distintas a la humana. En ciertas realizaciones, los anticuerpos pueden ser completamente específicos para una o más proteínas HER2 humanas y pueden no exhibir especies u otros tipos de reactividad cruzada no humana. La secuencia de aminoácidos completa de un HER2 humano ejemplar tiene el número de acceso Swiss-Prot P04626 (ERBB2_HUMAN; SEQ ID NO: 1). HER2 también se conoce como CD340, MLN 19, Neu, c-ErbB-2 y p185erbB2. El HER2 humano se designa como GenelD: 2064 por Entrez Gene y HGNC: 3430 por HGNC. HER2 puede codificarse en el gen designado *ERBB2*.

El uso de "HER2" en la presente memoria abarca todos los alelos conocidos o aún no descubiertos y formas polimórficas de HER2 humano. Los términos "HER2 humano" o "HER2" se usan en la presente memoria de manera equivalente y significan "HER2 humano" si no se indica específicamente de cualquier otra manera.

Los términos "anticuerpo que se une a HER2" y "anticuerpo anti-HER2" se usan en la presente memoria de manera intercambiable e incluyen anticuerpos o un fragmento de los mismos que se unen a HER2 humano, por ejemplo, a HER2 humano en forma aislada.

En una realización altamente preferente, el anticuerpo anti-HER2 comprende una cadena pesada y una cadena ligera de SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 11.

Como se usa en la presente memoria, el término "trastorno relacionado con HER2" incluye afecciones tales como cáncer, particularmente cáncer de mama metastásico, cáncer de mama temprano y cáncer gástrico metastásico y más particularmente cáncer de mama metastásico positivo para HER2.

Como se usa en la presente memoria, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano y no humano. La expresión "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etcétera. Preferentemente, el sujeto es un ser humano.

Una formulación "estable" es aquella en la que la proteína en sí misma retiene esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica tras el almacenamiento. Varias técnicas analíticas para medir la estabilidad de la proteína están disponibles en la técnica y se revisan, por ejemplo, en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Edición Vincent Lee, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Nueva York, Pubs. (1991) y Jones A (1993) Adv Drug Delivery Rev, 10: 29-90. La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada para un período de tiempo seleccionado. Preferentemente, la formulación es estable a temperatura ambiente (25 °C) o a 40 °C durante al menos 1 mes, preferentemente 2 meses, más preferentemente 6 meses y/o estable a aproximadamente 5 °C durante al menos 1 año y preferentemente durante al menos 2 años. Además, la formulación es preferentemente estable después de la congelación (a, por ejemplo, -40 °C) y descongelación de la formulación.

La "estabilidad física" de una proteína en una formulación farmacéutica se retiene si no muestra signos de agregación, precipitación y/o desnaturalización tras el examen visual del color y/o la claridad, o como se mide por dispersión de la luz UV o por cromatografía de exclusión por tamaño.

La "estabilidad química" de una proteína puede evaluarse detectando y cuantificando las formas de la proteína alteradas químicamente. La alteración química puede implicar una modificación del tamaño (por ejemplo, corte) que puede evaluarse mediante cromatografía de exclusión por tamaño, SDS-PAGE y/o ionización por desorción láser asistida por matriz/espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI/TOF MS), por ejemplo. Otro tipo de alteración química incluye la alteración de la carga (por ejemplo, que se produce como un resultado de la desamidación), que puede evaluarse mediante cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo.

El término "tampón" se refiere a una solución tamponada que resiste los cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base. Un tampón de esta invención tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0; y preferentemente 5,7. Los ejemplos de tampones que pueden controlar el pH en este intervalo incluyen acetato (por ejemplo, acetato de sodio), succinato (como succinato de sodio), gluconato, histidina, citrato y otros tampones de ácido orgánico.

Un "lioprotector" es una molécula que cuando se combina con una proteína de interés previene o reduce significativamente la inestabilidad química y/o física de la proteína tras la liofilización y el almacenamiento posterior. Los ejemplos de lioprotectores incluyen un poliol, un aminoácido, una metilamina como la betaína, una sal liotrópica como el sulfato de magnesio, propilenglicol, polietilenglicol, Pluronic y las combinaciones de los mismos. El lioprotector preferente es un azúcar no reductor tal como sacarosa y/o un alcohol de azúcar tal como manitol, más preferentemente

un azúcar no reductor tal como sacarosa. El lioprotector se agrega a la formulación de pre-liofilización en una "cantidad lioprotectora", lo que significa que después de la liofilización de la proteína en presencia de la cantidad lioprotectora del lioprotector, la proteína retiene su estabilidad e integridad física y química tras la liofilización y el almacenamiento.

5 Un "poliol" es una sustancia orgánica con múltiples grupos hidroxilo e incluye, por ejemplo, azúcares (azúcares reductores y no reductores), alcoholes de azúcar y ácidos de azúcar. Los polioles preferentes en la presente memoria tienen un peso molecular que es inferior a aproximadamente 600 kDa (por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 120 a aproximadamente 400 kDa). Un "azúcar reductor" es aquel que contiene un grupo hemiacetal que puede reducir los iones metálicos o reaccionar covalentemente con lisina y otros grupos amino en proteínas y un "azúcar no reductor" es uno que no tiene estas propiedades de un azúcar reductor. Los ejemplos de azúcares reductores son fructosa, 10 manosa, maltosa, lactosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa y glucosa. Los azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, sorbosa y rafinosa. Los alcoholes de azúcar incluyen manitol, xilitol, eritritol, treitol, sorbitol y glicerol. Un poliol para usar en una formulación que es estable a la congelación-descongelación es uno que no se cristaliza a la temperaturas de congelación (por ejemplo, -20 °C) de manera que desestabilice el anticuerpo en la 15 formulación.

Como se usa en la presente memoria, el término "agente de carga" se refiere a un compuesto que adiciona masa a la mezcla liofilizada y contribuye a la estructura física de la masa liofilizada (por ejemplo, facilita la producción de una masa liofilizada esencialmente uniforme que mantiene una estructura de poro abierto). Los ejemplos de agentes de carga 20 incluyen manitol, glicina, polietilenglicol y xorbitol.

Una formulación "líquida" es aquella que se prepara en un formato líquido. Dicha formulación puede ser adecuada para la administración directa a un paciente o, alternativamente, puede empaquetarse para almacenamiento en forma líquida, en estado congelado o en forma seca (por ejemplo, liofilizada) para su posterior reconstitución en forma líquida u otra 25 forma adecuado para la administración a un paciente.

Una formulación "liofilizada" es una que se prepara por liofilización de una formulación líquida o pre-liofilizada. La liofilización se lleva a cabo mediante la congelación de la formulación y subsecuentemente la sublimación del hielo del contenido congelado a una temperatura adecuada para el secado primario. Bajo esta condición, la temperatura del producto está por debajo de la temperatura de colapso de la formulación. Entonces una etapa de secado secundario puede llevarse a cabo, que produce una masa liofilizada adecuada. 30

Una formulación "reconstituida" es una que se prepara disolviendo una formulación de proteína liofilizada en un diluyente de manera que la proteína se dispersa en la formulación reconstituida. La formulación reconstituida debe ser adecuada para la administración (por ejemplo, administración parenteral) a un paciente a tratar con la proteína de interés. Los "diluyentes" adecuados útiles para la preparación de una formulación reconstituida incluyen los que son aceptables farmacéuticamente (seguros y no tóxicos para la administración a un ser humano). Ejemplos de diluyentes adecuados incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWFI). Agua para inyección (WFI), una solución amortiguadora de pH (por ejemplo, solución salina amortiguadora de fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa. 35 40

El anticuerpo comprendido en la formulación de la invención puede producirse, por ejemplo, mediante tecnología recombinante. Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo HER2 de la invención (por ejemplo, CDR o conjunto de CDR o dominio VH o dominio VL o sitio de unión a antígeno de anticuerpo o molécula de anticuerpo, por ejemplo scFv o IgG1 según se proporciona), puede expresarse mediante el cultivo en condiciones apropiadas de células hospederas recombinantes que contienen dicho ácido nucleico. Después de la producción por expresión, un dominio VH o VL, por ejemplo, pueden aislarse y/o purificarse mediante cualquier técnica adecuada, después usarse según corresponda. 45

Los anticuerpos, los dominios VH y/o VL, y las moléculas de ácido nucleico codificantes y los vectores pueden proporcionarse aislados y/o puros, por ejemplo, de su entorno natural, en forma sustancialmente pura u homogénea, o, en el caso del ácido nucleico, libre o sustancialmente libre de ácidos nucleicos o genes de origen que no sea la secuencia codificante del polipéptido con la función deseada. El ácido nucleico puede comprender ADN y/o ARN, y puede ser completamente o parcialmente sintético. 50

Los sistemas de clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de células hospederas diferentes se conocen bien. Las células hospederas adecuadas incluyen bacterias, células de mamíferos, células vegetales, levaduras y sistemas de baculovirus y plantas y animales transgénicos. 55

Las líneas de células de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster bebé, células del melanoma del ratón NSO, células de mieloma de rata YB2/0, células embrionarias de riñón humano, células embrionarias de retina humana y muchas otras. 60

Preferentemente, la línea celular de mamífero son células de ovario de hámster chino (CHO). Estos pueden ser deficientes en dihidrofolato reductasa (dhfr) y, por lo tanto, dependen de la timidina y la hipoxantina para el crecimiento (Urlaub G y Chasin LA (1980) PNAS, 77: 4216- 4220) La línea celular parental dhfr CHO se transfecta con el gen del 65

anticuerpo y el gen dhfr que permite la selección de transformantes de células CHO del fenotipo positivo para dhfr. La selección se lleva a cabo cultivando las colonias en medios desprovistos de timidina e hipoxantina, cuya ausencia impide que las células no transformadas crezcan y las células transformadas resalten la vía del folato y eviten de esta manera el sistema de selección. Estas transformantes generalmente expresan niveles bajos del producto del gen del en
5 virtud de la cointegración de ambos genes transfectados. Los niveles de expresión del gen del anticuerpo pueden incrementarse mediante amplificación usando metotrexato (MTX). Este medicamento es un inhibidor directo de la enzima dhfr y permite el aislamiento de colonias resistentes que amplifican su número de copias del gen dhfr lo suficiente como para sobrevivir en estas condiciones. Dado que los genes dhfr y anticuerpos están más estrechamente vinculados en los transformantes originales, generalmente hay una amplificación concomitante y, por lo tanto, una
10 mayor expresión del gen del anticuerpo deseado. Otro sistema de selección para usar con células CHO o mieloma es el sistema de amplificación de glutamina sintetasa (GS) descrito en WO87/04462. Este sistema implica la transfección de una célula con un gen que codifica la enzima GS y el gen del anticuerpo deseado. Luego se seleccionan las células que crecen en medio libre de glutamina. Estas clonas seleccionadas se someten después a la inhibición de la enzima GS usando metionina sulfoximina (MSX). Las células, para poder sobrevivir, amplificarán el gen GS con la amplificación concomitante del gen que codifica el anticuerpo de interés.

Los vectores adecuados pueden elegirse o construir, de manera que contengan secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias de terminación, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias, según convenga. Los vectores pueden ser plásmidos, virales por
20 ejemplo fagos, o fagémidos, según convenga. Para más detalles véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3da edición, Sambrook y otros, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de los ácidos nucleicos, por ejemplo en la preparación de constructos de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en las células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en Current Protocols in Molecular Biology, Segunda Edición, Ausubel y otros edición, John Wiley & Sons, 1988, Short Protocols in Molecular Biology; A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular
25 Biology, Ausubel y otros edición, John Wiley & Sons, 4ta edición 1999.

La introducción de un ácido nucleico en una célula hospedera puede emplear cualquier técnica disponible. Para las células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir la transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción mediante el uso de retrovirus u otros virus, por
30 ejemplo, vaccinia o, en células de insecto, baculovirus. Para la introducción del ácido nucleico en la célula hospedera, en particular, una célula eucariota, se puede usar o un sistema que se basa en un virus o en un plásmido. El sistema de plásmido puede mantenerse en forma episomal o puede incorporarse a la célula hospedera o en un cromosoma artificial (Csonka E y otros, (2000) Journal of Cell Science, 113: 3207-3216; Vanderbyl S y otros, (2002) Molecular Therapy, 5(5):
35 10. La incorporación puede ser por integración aleatoria o específica de una o más copias en un único o en múltiples loci. Para las células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir la transformación con cloruro de calcio, la electroporación y la transfección mediante el uso de bacteriófagos.

La introducción puede seguirse por originar o permitir la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, mediante el cultivo
40 de las células hospederas en las condiciones para la expresión del gen. En una realización, el ácido nucleico de la invención se integra en el genoma (por ejemplo en un cromosoma) de la célula hospedera. La integración puede promoverse mediante la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas estándar.

Una realización adicional proporciona un proceso para purificar un anticuerpo anti HER2 que comprende una o más etapas de separación cromatográfica en la que cada una de dichas etapas de separación comprende la elución con un
45 tampón de elución que comprende uno o más excipientes aceptables farmacéuticamente.

Preferentemente, la una o más etapas de separación cromatográfica se seleccionan de cromatografía de afinidad (por
50 ejemplo, cromatografía de afinidad de proteína A o de proteína G), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico y aniónico), cromatografía de interacción hidrófoba (por ejemplo, cromatografía de fenilo), cromatografía de hidroxipatita, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad con metal inmovilizado, cromatografía de interacción hidrófila, cromatografía de adsorción tiofílica, cromatografía de adsorción de euglobulina, cromatografía de ligando de colorante o cromatografía de boronato inmovilizado. Con la máxima
55 preferencia, la separación cromatográfica se realiza mediante cromatografía de afinidad de proteína A seguida de cromatografía de intercambio catiónico y/o seguida de cromatografía de interacción hidrófoba o cromatografía de intercambio aniónico.

60 Formulaciones farmacéuticas

La formulación farmacéutica de la invención puede ser una formulación líquida, una formulación liofilizada o una
60 formulación reconstituída.

El volumen de dosis deseado y el modo final de administración de la formulación se tienen en cuenta al determinar la
65 cantidad de anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo para incluir en la formulación. Preferentemente, el anticuerpo anti-HER2 de un fragmento del mismo está presente dentro de la formulación farmacéutica en una cantidad

de entre 1 mg/ml y 100 mg/ml, más preferentemente 5 mg/ml y 50 mg/ml, aún más preferentemente 10 mg/ml y 40 mg/ml, especialmente 20 mg/ml y 30 mg/ml.

- 5 La formulación puede tamponarse a un pH de 5,0 - 6,0, preferentemente pH 5,5 - 5,9, más preferentemente pH 5,6 - 5,8, aún más preferentemente pH 5,7±0,2, con la máxima preferencia pH 5,7±0,1. La especificación proporciona tampones que pueden usarse para controlar el pH en este intervalo seleccionado del grupo que consiste en acetato, citrato, succinato, gluconato, histidina, fosfato, glutámico, cacodilato, maleato de hidrógeno sódico, tris-(hidroximetil)aminometano (Tris), Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), imidazol y otros tampones de ácido orgánico. Preferentemente, el tampón es un tampón de acetato, más preferentemente acetato de sodio.
- 10 Preferentemente, el tampón de acetato está presente dentro de la formulación en una cantidad de entre 1-50 mM, más preferentemente 1-20 mM, aún más preferentemente 1-10 mM.

- 15 Preferentemente, se agrega un "excipiente aceptable farmacéuticamente" a la formulación líquida. Se apreciará que las referencias a "excipiente aceptable farmacéuticamente" incluyen referencias a cualquier excipiente usado convencionalmente en formulaciones farmacéuticas. Dichos excipientes pueden incluir típicamente uno o más tensioactivos, lioprotectores, agentes de carga, sales inorgánicas u orgánicas, estabilizantes, diluyentes, solubilizantes, agentes reductores, antioxidantes, agentes quelantes, conservantes y similares.

- 20 Dado que es conveniente que una formulación parenteral sea isotónica con los fluidos corporales (es decir, aproximadamente 284mOsm/L), la memoria proporciona una formulación en la que puede agregarse un tonicificador a la formulación farmacéutica. Un ejemplo de un tonicificador comúnmente usado es la sal cloruro de sodio. Preferentemente, el tonicificador está presente en la formulación líquida a una concentración de 50 a 400 mM, más preferentemente de 100 a 300 mM, aún más preferentemente de 200 a 250 mM. Sin embargo, generalmente no se agrega un tonicificador a una formulación liofilizada, por lo tanto, antes de la liofilización, puede eliminarse un
- 25 tonicificador de la formulación. Un tonicificador puede estar presente en el diluyente para formulaciones reconstituidas.

- La memoria proporciona un tensioactivo seleccionado del grupo que consiste en: tensioactivos no iónicos (HLB 6 a 18) tales como ésteres de ácido graso de sorbitán (por ejemplo, monocaprilato de sorbitán, monolaurato de sorbitán, monopalmitato de sorbitán), ésteres de ácido graso de glicerina (por ejemplo, monocaprilato de glicerina, glicerina monomiristato, monoestearato de glicerina), ésteres de ácido graso de poliglicerina (por ejemplo, decagliceril monoestearato, decatearato de decaglicerilo, monolinoleato de decaglicerilo), ésteres de ácido graso de polioxietilen sorbitano (por ejemplo triestearato de polioxietilen sorbitán), ésteres de ácido graso de polioxietilen sorbitol (por ejemplo, tetraestearato de polioxietilen sorbitol, tetraoleato de polioxietilen sorbitol), ésteres de ácido graso de polioxietilen glicerina (por ejemplo, monoestearato de polioxietilenglicerilo graso), por ejemplo I diestearato), éteres de alquilo de polioxietileno (por ejemplo polioxietilen lauril éter), polioxipropileno polioxietileno alquil éteres (por ejemplo, polioxietileno polioxipropileno glicol éter, polioxietileno polioxipropileno propilo éter, polioxietileno polioxipropileno cetil éter), polioxietilen alquilfenil éteres (por ejemplo, polioxietilen nonilfenil éter), polioxietilen aceites de ricino hidrogenados (por ejemplo, aceite de ricino de polioxietileno, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno), derivados de cera de abejas de polioxietileno (por ejemplo, cera de abejas de polioxietilen sorbitol), derivados de lanolina de polioxietileno (por ejemplo, polioxietilen lanolina) y amidas de ácidos grasos de polioxietileno (por ejemplo, polioxietilen estearil amida); tensioactivos aniónicos como C₁₀-C₁₈ sales de alquil sulfatos (por ejemplo, cetil sulfato de sodio, lauril sulfato de sodio, oleil sulfato de sodio), polioxietileno C₁₀-C₁₈ sales de alquil éter sulfatos con un promedio de 2 a 4 moles de óxido de etileno (por ejemplo, polioxietilen sulfato de sodio) y C₈-C₁₈ sales de éster de alquil sulfosuccinato (por ejemplo, éster de lauril sulfosuccinato de sodio); y tensioactivos naturales como lecitina, glicerofosfolípido, esfingofosfolípidos (por ejemplo, esfingomielina) y ésteres de sacarosa de C₁₂-C₁₈ ácidos grasos.
- 30
- 35
- 40
- 45

- Preferentemente, el tensioactivo se selecciona de ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitán. De manera particularmente preferente, el tensioactivo es Polisorbato 20, 21, 40, 60, 65, 80, 81 y 85, con la máxima preferencia Polisorbato 80. Polisorbato 80 también es conocido por la marca Tween 80™ (ICI Americas, Inc.).
- 50 Preferentemente, el tensioactivo está presente dentro de la formulación en una cantidad entre 0,001 y 0,1 % (p/p), más preferentemente entre 0,001 y 0,05 % (p/p), aún más preferentemente entre 0,005 y 0,02 % (p/p).

- También puede agregarse un solubilizante para aumentar la solubilización del anticuerpo en solución. Los ejemplos de solubilizantes incluyen aminoácidos tales como prolina o glicina, propilenglicol, povidonas de plasdon C y K, ciclodextrinas y polímeros de plasdon K. Preferentemente, el solubilizante se agrega a la formulación a una concentración de 1-50 mg/ml, preferentemente 5-40 mg/ml, más preferentemente 10-30 mg/ml.
- 55

- La memoria proporciona formulaciones farmacéuticas de la invención que también pueden comprender excipientes adicionales tales como agentes reductores, antioxidantes y/o agentes quelantes.
- 60

Los ejemplos de un agente reductor incluyen N-acetilcisteína, N-acetilhomocisteína, ácido tióctico, tioglicol, tioetanolamina, tioglicerol, tiosorbitol, ácido tioglicólico y una sal del mismo, tiosulfato de sodio, glutatión y un ácido C₁-C₇ tioalcanoico.

Los ejemplos de un antioxidante incluyen aminoácidos tales como metionina, ácido eritórico, dibutilhidroxitolueno, butilhidroxianisol, alfa-tocoferol, acetato de tocoferol, ácido L-ascórbico y una sal del mismo, palmitato de ácido L-ascórbico, estearato de ácido L-ascórbico, bisulfito de sodio, sodio sulfito, galato de triamilo y galato de propilo.

- 5 Los ejemplos de un agente quelante incluyen etilendiaminotetraacetato de disodio (EDTA), pirofosfato de sodio y metafosfato de sodio.

No todos los excipientes en una formulación líquida son adecuados para incluir una forma liofilizada de la formulación y, por lo tanto, se pueden realizar varios cambios en la formulación líquida para hacerla adecuada para la liofilización.

10

Puede agregarse un estabilizador a la formulación para estabilizar la proteína en la forma liofilizada. Los ejemplos de un estabilizador incluyen creatinina, un aminoácido seleccionado de histidina, alanina, ácido glutámico, glicina, leucina, fenilalanina, metionina, isoleucina, prolina, ácido aspártico, arginina, lisina y treonina, un carbohidrato seleccionado de sacarosa, trehalosa, sorbitol, xilitol y manosa, tensioactivos seleccionados de polietilenglicol (PEG; por ejemplo, PEG3350 o PEG4000) o ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitán (por ejemplo, Polisorbato 20 o Polisorbato 80), o cualquier combinación de los mismos.

15

En un aspecto preferente, el estabilizador comprende un lioprotector, que puede seleccionarse de un azúcar no reductor (por ejemplo, sacarosa o trehalosa) y/o un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol). La adición de un lioprotector ayuda a reducir la cantidad de degradación o agregación de la proteína tras la liofilización. Preferentemente, la formulación liofilizada es isotónica tras la reconstitución; por lo tanto, la cantidad de lioprotector en la formulación liofilizada debería ser suficiente para lograr una formulación reconstituida isotónica. Alternativamente, la formulación reconstituida puede ser hipertónica y, por lo tanto, se requiere una mayor cantidad de lioprotector en la formulación liofilizada. Por el contrario, si se agrega muy poco lioprotector a la formulación liofilizada, puede ocurrir una cantidad inadecuada de degradación o agregación de anticuerpos tras la liofilización.

20

25

Preferentemente, el lioprotector en la formulación liofilizada es un azúcar no reductor y/o un alcohol de azúcar, más preferentemente sacarosa y/o manitol. En una realización preferente, el lioprotector en la formulación liofilizada es sacarosa. Preferentemente, el lioprotector está presente en la formulación liofilizada a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 700 mM, preferentemente de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 600 mM, más preferentemente de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 500 mM, aún más preferentemente de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 400 mM.

30

Preferentemente, el lioprotector está presente en la formulación liofilizada en una cantidad entre 1-100 % (p/p), preferentemente 2-50 % (p/p), más preferentemente 3-25 %, aún más preferentemente 5-20 % (p/p).

35

La memoria proporciona una formulación liofilizada que comprende un lioprotector en el que preferentemente la relación molar de anticuerpo a lioprotector puede estar en el intervalo de 100 a aproximadamente 3.000 moles de lioprotector a 1 mol de anticuerpo, preferentemente de aproximadamente 500 a aproximadamente 2.500 moles de lioprotector a 1 mol de anticuerpo, más preferentemente de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 2.250 moles de lioprotector a 1 mol de anticuerpo, aún más preferentemente de aproximadamente 1.500 a 2.000 moles.

40

Preferentemente, la formulación liofilizada comprende un agente de carga. Los ejemplos de agentes de carga incluyen manitol, glicina, polietilenglicol, xorbitol, lactosa anhidra, sacarosa, D(+)-trehalosa, dextrano 40 y povidona (PVP K24). Preferentemente, el agente de carga está presente en la formulación liofilizada a una concentración de aproximadamente 50 a 200 mM, preferentemente de aproximadamente 100 a 150 mM. Preferentemente, el agente de carga está presente en la formulación liofilizada en una cantidad entre 0,1 y 10 % (p/p), preferentemente entre 0,2 y 8 % (p/p), más preferentemente entre 0,5 y 5 % (p/p).

45

Una vez que se prepara una formulación liofilizada, el material se somete a liofilización. Esto puede lograrse utilizando una serie de liofilizadores disponibles comercialmente. Estos funcionan congelando el material y después reduciendo la presión circundante para permitir que el agua congelada en el material se sublimar directamente desde la fase sólida a la fase gaseosa. También puede llevarse a cabo una fase secundaria de secado. La memoria indica que la formulación liofilizada comprende un contenido de humedad de menos del 5 %, preferentemente menos del 4 %, más preferentemente menos del 3 %, aún más preferentemente menos del 2 %.

50

La formulación liofilizada puede reconstituirse con un diluyente de manera que la concentración de anticuerpo en la formulación reconstituida esté presente en una cantidad de entre 1 y 100 mg/ml, más preferentemente 1 y 50 mg/ml.

60

Los diluyentes para usarse en la reconstitución incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWFI), agua para inyección (WFI), una solución amortiguadora de pH (por ejemplo, solución salina amortiguada de fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

Puede agregarse un conservante al diluyente para reducir la acción bacteriana en la formulación reconstituida. La memoria proporciona un conservante seleccionado del grupo que consiste en: cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en los que los

65

grupos alquilo son compuestos de cadena larga), cloruro de bencetonio, alcoholes aromáticos como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquil parabenos tales como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol.

5 En un aspecto de la presente divulgación, se produce una formulación farmacéutica como una formulación líquida. Preferentemente, el anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo está presente dentro de la formulación líquida en una cantidad de entre 1 mg/ml y 100 mg/ml, preferentemente 5 mg/ml y 50 mg/ml, preferentemente 10 mg/ml y 40 mg/ml, más preferentemente 15 mg/ml y 30 mg/ml, aún más preferentemente 20-25 mg/ml, especialmente 21 mg/ml.

10 La formulación líquida se puede tamponar a un pH de 5,0 - 6,0, preferentemente pH 5,5 - 5,9, más preferentemente pH 5,6 - 5,8, aún más preferentemente pH 5,7±0,2, con la máxima preferencia pH 5,7±0,1, especialmente pH 5,7. Como se detalla en el Ejemplo 1, los solicitantes demuestra que un tampón de acetato confiere una estabilidad significativa a la formulación líquida, en comparación con, por ejemplo, un tampón de citrato. Por lo tanto, el tampón preferente es el tampón de acetato, más preferentemente acetato de sodio. Preferentemente, el tampón de acetato está presente dentro de la formulación líquida en una cantidad entre 1-50 mM, preferentemente 1-20 mM, más preferentemente 1-10 mM, aún más preferentemente 2-7 mM, especialmente 4 mM.

Preferentemente, un tonicificador está presente en la formulación líquida a una concentración de 50 a 400 mM, preferentemente 100 a 300 mM, más preferentemente 200 a 250 mM, aún más preferentemente 210-220 mM, especialmente 214 mM.

Preferentemente, se agrega un tensioactivo a la formulación líquida, que puede seleccionarse de ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitán. De manera particularmente preferente, el tensioactivo es Polisorbato 80 (también conocido por la marca Tween 80™ (ICI Americas, Inc.)).

25 Preferentemente, el tensioactivo está presente dentro de la formulación líquida en una cantidad entre 0,001 y 0,1 % (p/p), más preferentemente entre 0,002 y 0,05 % (p/p), aún más preferentemente entre 0,005 y 0,02 % (p/p) y especialmente 0,01 % (p/p).

30 Preferentemente se agrega un solubilizante a la formulación líquida. El solubilizador puede ser prolina o glicina, preferentemente prolina. Preferentemente, el solubilizante se agrega a la formulación a una concentración de 1-50 mg/ml, preferentemente 5-40 mg/ml, más preferentemente 10-30 mg/ml, aún más preferentemente 15-25 mg/ml, con la máxima preferencia a 20 mg/ml.

35 En un aspecto preferente, la formulación líquida comprende un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo y excipientes aceptables farmacéuticamente, tamponados a un pH de 5,7±0,2 con tampón de acetato. En una realización preferente adicional de la invención, la formulación líquida comprende un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo formulado con NaCl, prolina, Polisorbato 80 y acetato de sodio, a un pH de 5,7. Preferentemente, el anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera de SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 11.

45 En otro aspecto adicional, la formulación líquida comprende 10-40 mg/ml de un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo, NaCl 200-250 mM, 10-30 mg/ml de prolina, 0,005 y 0,02 % (p/p) de Polisorbato 80 y 1-10 mM de tampón de acetato de sodio, en el que el pH de la formulación es pH 5,7±0,2. Preferentemente, el anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera de SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 11.

50 En un aspecto preferente, la formulación líquida comprende 21 mg/ml de un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo, NaCl 214 mM, prolina 20 mg/ml, Polisorbato 80 al 0,01 % (p/p) y tampón de acetato de sodio 4 mM, en el que el pH de la formulación es pH5,7. Preferentemente, el anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera de SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 11.

En otro aspecto, la formulación farmacéutica comprende una formulación liofilizada de un anticuerpo.

55 Preferentemente, el anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo está presente dentro de la formulación liofilizada en una cantidad de entre 1 mg/ml y 100 mg/ml, preferentemente 5 mg/ml y 80 mg/ml, preferentemente 10 mg/ml y 60 mg/ml, preferentemente 15 mg/ml. ml y 40 mg/ml, más preferentemente 20-40 mg/ml, aún más preferentemente 25-35 mg/ml, especialmente 30 mg/ml.

60 La formulación liofilizada se puede tamponar a un pH de 5,0 - 6,0, preferentemente pH 5,5 - 5,9, más preferentemente pH 5,6 - 5,8, aún más preferentemente pH 5,7±0,2, con la máxima preferencia pH 5,7±0,1, especialmente pH 5,7. El tampón preferente es el tampón de acetato, más preferentemente el acetato de sodio. Preferentemente, el tampón de acetato está presente dentro de la formulación liofilizada en una cantidad entre 1-50 mM, preferentemente 1-20 mM, más preferentemente 1-10 mM, aún más preferentemente 3-7 mM, especialmente 5-6 mM.

65 En un aspecto preferente, la formulación liofilizada comprende un estabilizador. Preferentemente, el estabilizador es un lioprotector, que es un azúcar no reductor y/o un alcohol de azúcar. Preferentemente, el lioprotector es sacarosa y/o

- manitol, con la máxima preferencia sacarosa. Preferentemente, el lioprotector está presente en la formulación liofilizada a una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 700 mM, preferentemente de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 600 mM, más preferentemente de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 500 mM, aún más preferentemente de aproximadamente 300 mM a aproximadamente 400 mM y con la máxima preferencia a aproximadamente 350 mM.
- En una formulación liofilizada que comprende sacarosa como el lioprotector, preferentemente la sacarosa está presente en la formulación liofilizada en una cantidad entre 1-90 % (p/p), preferentemente 2-50 % (p/p), preferentemente 4-25 % (p/p), más preferentemente 7-20 % (p/p), aún más preferentemente 10-15 % (p/p) y con la máxima preferencia en una cantidad de 12 % (p/p).
- En una formulación liofilizada que comprende manitol como el lioprotector, preferentemente el manitol está presente en la formulación liofilizada en una cantidad entre 0,1-20 % (p/p), preferentemente, 0,5-10 %, más preferentemente 1-6 %, aún más preferentemente 2-4 %, con la máxima preferencia 2 %.
- En una formulación liofilizada que comprende sacarosa como el lioprotector, preferentemente la relación molar de anticuerpo anti-HER2 a lioprotector puede estar en el intervalo de 100 a aproximadamente 3.000 moles de lioprotector a 1 mol de anticuerpo, preferentemente de aproximadamente 500 a aproximadamente 2.500 moles de lioprotector a 1 mol de anticuerpo, más preferentemente de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 2.250 moles de lioprotector a 1 mol de anticuerpo, aún más preferentemente de aproximadamente 1.500 a 2.000 moles. Lo con la máxima preferencia, la relación molar de anticuerpo anti-HER2 a lioprotector puede ser de aproximadamente 1.750 moles de lioprotector a 1 mol de anticuerpo.
- Preferentemente, la formulación liofilizada comprende un agente de carga. Preferentemente, el agente de carga es glicina presente en la formulación liofilizada a una concentración de aproximadamente 50 a 200 mM, preferentemente de aproximadamente 100 a 150 mM, más preferentemente de aproximadamente 120 a 140 mM, aún más preferentemente de aproximadamente 130 mM a 135 mM. Preferentemente, el agente de carga está presente en la formulación liofilizada en una cantidad entre 0,1 y 10 % (p/p), preferentemente entre 0,2 y 8 % (p/p), más preferentemente entre 0,5 y 5 % (p/p), aún más preferentemente entre 0,7 y 3 % (p/p) y con la máxima preferencia al 1 % (p/p).
- Preferentemente, la formulación liofilizada comprende un tensioactivo, que se selecciona de ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitán. Preferentemente, el tensioactivo es Polisorbato 80 (también conocido por el nombre de marca Tween 80™ (ICI Americas, Inc.)). Preferentemente, el tensioactivo está presente dentro de la formulación liofilizada en una cantidad de entre 0,001 y 0,1 % (p/p), más preferentemente entre 0,002 y 0,05 % (p/p), aún más preferentemente entre 0,005 y 0,02 % (p/p) y especialmente 0,014 % (p/p).
- En un aspecto preferente, la formulación liofilizada comprende un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo, estabilizadores y un tensioactivo, tamponado a un pH de $5,7 \pm 0,2$ con tampón de acetato. En una realización preferente adicional de la invención, la formulación liofilizada comprende un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo, glicina, sacarosa, polisorbato 80 y acetato de sodio, a un pH de $5,7 \pm 0,2$. Preferentemente, el anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera de SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 11.
- En un aspecto preferente adicional, la formulación liofilizada comprende 20-40 mg/ml de un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo, 10-15 % (p/p) de sacarosa, 0,5-5 % (p/p) de glicina, 0,005-0,02 % (p/p) de Polisorbato 80 y acetato de sodio 1-10 mM, en el que el pH de la formulación es pH $5,7 \pm 0,2$. Preferentemente, el anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera de SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 11.
- En otro aspecto preferente, la formulación liofilizada comprende 30 mg/ml de un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo, 12 % (p/p) de sacarosa, 1 % (p/p) de glicina, 0,014 % (p/p) de polisorbato acetato de sodio 80 y 5,75 mM, en el que el pH de la formulación es pH 5,7. Preferentemente, el anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera de SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 11.
- En un aspecto aún preferente, la formulación liofilizada comprende 20-40 mg/ml de un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo, sacarosa 300-400 mM, glicina 120-140 mM, polisorbato 80 al 0,005-0,02 % (p/p) y 1-10 mM acetato de sodio, en el que el pH de la formulación es pH $5,7 \pm 0,2$. Preferentemente, el anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera de SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 11.
- En un aspecto aún preferente, la formulación liofilizada comprende 30 mg/ml de un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo, sacarosa 350 mM, glicina 133 mM, polisorbato 80 al 0,014 % (p/p) y acetato de sodio 5,75 mM, en el que el pH de la formulación es pH 5,7. Preferentemente, el anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera de SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 11.
- Una vez que se prepara la formulación liofilizada, el material se somete a liofilización. Preferentemente, la formulación después de la liofilización comprende un contenido de humedad de menos del 5 %, preferentemente menos del 4 %, más preferentemente menos del 3 %, aún más preferentemente menos del 2 % y especialmente entre 1 % y 2 %.

En otro aspecto, la formulación farmacéutica comprende una formulación reconstituida de un anticuerpo.

La formulación liofilizada puede reconstituirse con un diluyente de manera que la concentración del anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo en la formulación reconstituida esté presente en una cantidad de entre 1 mg/ml y 100 mg/ml, preferentemente 5 mg/ml y 50 mg/ml., preferentemente 10 mg/ml y 40 mg/ml, más preferentemente 15 mg/ml y 30 mg/ml, aún más preferentemente 20 y 25 mg/ml, especialmente 21 mg/ml.

Los diluyentes para usar en la reconstitución de la formulación liofilizada incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWFI), agua para inyección (WFI), una solución amortiguadora de pH como solución salina tamponada de fosfato, solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa. Preferentemente, el diluyente para uso en la reconstitución de la formulación liofilizada de la presente invención es WFI.

El diluyente puede añadirse en una cantidad de entre 0,1-100 ml, preferentemente entre 1-50 ml, más preferentemente entre 2-30 ml, aún más preferentemente entre 3-15 ml, especialmente entre 5-10 ml, para producir una solución de anticuerpo a la deseada concentración. Preferentemente, la formulación liofilizada se reconstituye para producir una concentración de proteína de 21 mg/ml con 7,2ml de WFI. Preferentemente, la formulación reconstituida se tampona a un pH de 5,0 - 6,0, más preferentemente pH 5,7±0,2, aún más preferentemente 5,7±0,1, con la máxima preferencia pH 5,7. Preferentemente, el tampón es un tampón de acetato, más preferentemente acetato de sodio. Preferentemente, el acetato de sodio está presente dentro de la formulación reconstituida en una cantidad de entre 1-50 mM, preferentemente 1-20 mM, más preferentemente 1-10 mM, aún más preferentemente 2-6 mM, especialmente 4 mM.

Preferentemente, la formulación reconstituida comprende un tensioactivo, que se selecciona de ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán. Preferentemente, el tensioactivo es Polisorbato 80 (también conocido por el nombre de marca Tween 80™ (ICI Americas, Inc.)). Preferentemente, el tensioactivo está presente dentro de la formulación reconstituida en una cantidad entre 0,001 y 0,1 % (p/p), más preferentemente entre 0,002 y 0,05 % (p/p), aún más preferentemente entre 0,005 y 0,02 % (p/p) y especialmente 0,01 % (p/p).

En un aspecto preferente, la formulación reconstituida comprende un estabilizador. Preferentemente, el estabilizador es un lioprotector, que es un azúcar no reductor y/o un alcohol de azúcar. Preferentemente, el lioprotector es sacarosa y/o manitol, con la máxima preferencia sacarosa. Preferentemente, el lioprotector está presente en la formulación reconstituida a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 700 mM, preferentemente de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 600 mM, más preferentemente de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 500 mM, aún más preferentemente de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 300 mM y con la máxima preferencia a aproximadamente 225 mM a aproximadamente 275 mM, especialmente aproximadamente 250 mM.

Preferentemente, el lioprotector es sacarosa, presente en la formulación reconstituida en una cantidad entre 1-50 % (p/p), preferentemente 2-25 % (p/p), preferentemente 4-20 % (p/p), más preferentemente 5-15 % (p/p), aún más preferentemente 6-10 % (p/p) y con la máxima preferencia en una cantidad de 8,4 % (p/p).

En una formulación reconstituida que comprende manitol como el lioprotector, preferentemente el manitol está presente en la formulación liofilizada en una cantidad entre 0,1-20 % (p/p), preferentemente, 0,5-10 %, más preferentemente 1-6 %, aún más preferentemente 2-4 %, con la máxima preferencia 2 %.

En la formulación reconstituida que comprende sacarosa como el lioprotector, preferentemente la relación molar de anticuerpo anti-HER2 a lioprotector puede estar en el intervalo de 100 a aproximadamente 3.000 moles de lioprotector a 1 mol de anticuerpo, preferentemente de aproximadamente 500 a aproximadamente 2.500 moles de lioprotector a 1 mol de anticuerpo, más preferentemente de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 2.000 moles de lioprotector a 1 mol de anticuerpo. Lo con la máxima preferencia, la relación molar de anticuerpo anti-HER2 a lioprotector puede ser de aproximadamente 1.750 moles de lioprotector a 1 mol de anticuerpo.

Preferentemente, la formulación reconstituida comprende un agente de carga. Preferentemente, el agente de carga es glicina presente en la formulación reconstituida a una concentración de aproximadamente 50 a 200 mM, preferentemente de aproximadamente 60 a 150 mM, más preferentemente de aproximadamente 70 a 120 mM, aún más preferentemente de aproximadamente 80 mM a 100 mM, con la máxima preferencia a aproximadamente 90 mM. Preferentemente, el agente de carga está presente en la formulación liofilizada en una cantidad entre 0,1 y 10 % (p/p), preferentemente entre 0,2 y 5 % (p/p), más preferentemente entre 0,5 y 2 % (p/p), aún más preferentemente al 0,7 % (p/p).

En un aspecto preferente, la formulación liofilizada reconstituida comprende un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo, estabilizadores, un tensioactivo y un diluyente, tamponado a un pH de 5,7±0,2 con tampón de acetato. En una realización preferente adicional de la invención, la formulación liofilizada reconstituida comprende un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo, glicina, sacarosa, polisorbato 80, WFI y acetato de sodio a un pH de 5,7±0,2. Preferentemente, el anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera de SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 11.

En un aspecto preferente, la formulación liofilizada reconstituida comprende 15-30 mg/ml de un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo, 5-15 % (p/p) de sacarosa, 0,5-2 % (p/p) de glicina, 0,005-0,02 % (p/p) de Polisorbato 80, WFI y acetato de sodio 1-10 mM, en el que el pH de la formulación es pH 5,7±0,2. Preferentemente, el anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera de SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 11.

En un aspecto preferente, la formulación liofilizada reconstituida comprende 21 mg/ml de un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo, 8,4 % (p/p) de sacarosa, 0,7 % (p/p) de glicina, 0,01 % (p/p) de polisorbato 80, WFI y acetato de sodio 4 mM, en el que el pH de la formulación es pH 5,7. Preferentemente, el anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera de SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 11.

En un aspecto preferente adicional, la formulación liofilizada reconstituida comprende 15-30 mg/ml de un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo, sacarosa 225-275 mM, glicina 80-100 mM, polisorbato 80 0,005-0,02 % (p/p), 5-10 ml de WFI y tampón de acetato de sodio 1-10 mM, en el que el pH de la formulación es pH 5,7±0,2. Preferentemente, el anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera de SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 11.

En otro aspecto preferente, la formulación liofilizada reconstituida comprende 21 mg/ml de un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo, sacarosa 246 mM, glicina 90 mM, polisorbato 80 al 0,01 % (p/p), 7,2 ml de WFI y tampón de acetato de sodio 4 mM, en el que el pH de la formulación es pH 5,7. Preferentemente, el anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera de SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 11.

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona un uso de una formulación de anticuerpo farmacéutico como se define en la presente memoria para el tratamiento de un trastorno relacionado con HER2. Preferentemente, el trastorno relacionado con HER2 se selecciona de cáncer. La memoria proporciona ejemplos de cáncer a tratar en la presente memoria seleccionado del grupo que consiste en, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias linfoides. Los ejemplos más particulares de estos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de la glándula salivar, cáncer renal o de riñón, cáncer de próstata, cáncer de la vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como también cáncer de cabeza y cuello. Ejemplos más particulares incluyen un cáncer HER2 positivo tal como cáncer de mama metastásico, cáncer de mama temprano y cáncer gástrico metastásico. Con la máxima preferencia, el trastorno relacionado con HER2 es cáncer de mama metastásico positivo para HER2.

La divulgación proporciona además una formulación de anticuerpo farmacéutico como se define en la presente memoria, para uso como tratamiento o profilaxis de un trastorno relacionado con HER2.

La divulgación proporciona además una formulación de anticuerpo farmacéutico como se define en la presente memoria para uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con HER2.

La formulación farmacéutica puede ser una formulación líquida, una formulación liofilizada o una formulación reconstituida, es decir, una formulación liofilizada que se reconstituye antes de su uso. Por lo general, se proporciona una formulación líquida en forma de envases con un volumen definido, incluidos viales de plástico o vidrio sellados y esterilizados, ampollas y jeringas, así como también en forma de envases de gran volumen como botellas. Una formulación liofilizada generalmente se proporciona en forma de un polvo de un peso definido en viales de vidrio o plástico sellados y esterilizados. El polvo se reconstituye antes de su uso. Preferentemente, la formulación farmacéutica de la invención es una formulación liofilizada. Más preferentemente, la formulación farmacéutica de la invención es una formulación reconstituida. La formulación farmacéutica de la invención puede administrarse por vía oral o por inyección (por ejemplo, por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal o intramuscular), o por inhalación o por vía tópica (por ejemplo, intraocular, intranasal, rectal, en heridas, en la piel). La vía de administración se puede determinar por las características físico-químicas del tratamiento, por consideraciones especiales para la enfermedad o por la necesidad de optimizar la eficacia o reducir al mínimo los efectos secundarios. Preferentemente, la formulación de la invención se administra por infusión intravenosa, por ejemplo, como un bolo y/o por infusión continua durante un período de tiempo.

La memoria divulga también un artículo de fabricación que comprende:

- (a) un contenedor que contiene una formulación liofilizada de un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo, un lioprotector y un tampón de acetato; e
- (b) instrucciones para reconstituir la formulación liofilizada con un diluyente a una concentración de anticuerpo en la formulación reconstituida de aproximadamente 10-40 mg/ml.

Preferentemente, la formulación liofilizada se reconstituye con un diluyente para producir una concentración de anticuerpo de aproximadamente 12-30 mg/ml. Más preferentemente, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 15-25 mg/ml, aún más preferentemente de aproximadamente 21 mg/ml.

Las formulaciones proporcionadas pueden administrarse a individuos. La administración es preferentemente en una "cantidad terapéuticamente efectiva", esto es suficiente para mostrar el beneficio para un paciente. Dichos beneficios pueden ser al menos la mejoría de al menos un síntoma. La cantidad real administrada y la velocidad y el curso temporal de la administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se trata. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre dosis, etcétera, es responsabilidad de los médicos. Las dosis apropiadas de anticuerpos se conocen bien en la técnica (Ledermann JA y otros, (1999) Int J Cancer 47: 659-664; Bagshawe KD y otros, (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals, 4: 915-922) La memoria proporciona indicaciones sobre la dosificación para la administración, incluso si la dosis precisa dependerá de varios factores, incluyendo el tamaño y la ubicación del área a tratar, el peso corporal del paciente, la naturaleza precisa del anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo completo o un fragmento) y cualquier agente terapéutico adicional administrado antes, en el momento o después de la administración del anticuerpo. Una dosis de anticuerpo típica estará en el intervalo de 2mg/kg a 8mg/kg para administración intravenosa.

El anticuerpo o fragmento del mismo se administra adecuadamente al paciente en una vez o en una serie de tratamientos. En dependencia de la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 0,1mg/kg a aproximadamente 15mg/kg del anticuerpo es una dosificación candidata inicial típica para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica puede variar de aproximadamente 0,1mg/kg a 50mg/kg o más, en dependencia de los factores mencionados anteriormente. Para las administraciones repetidas durante varios días o más, en dependencia de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que ocurra una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. La dosis preferente del anticuerpo estará en el intervalo de aproximadamente 0,05mg/kg a aproximadamente 10mg/kg. Así, una o más dosis de aproximadamente 0,5mg/kg, 2,0mg/kg, 4,0mg/kg o 10mg/kg (o cualquier combinación de estos) puede administrarse al paciente. Tales dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo de manera que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente 20, o por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo anti-HER2). Puede administrarse una dosis inicial de carga más elevada, seguida de una o más dosis más bajas. Un régimen de dosificación ejemplar comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4mg/kg a 8mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2mg/kg a 6mg/kg del anticuerpo anti-HER2. Preferentemente, la dosis de carga inicial es de 8mg/kg seguida de una dosis semanal o tres semanal de 2mg/kg o 6mg/kg, respectivamente.

Pueden combinarse otros regímenes terapéuticos con la administración del anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo. La administración combinada incluye la coadministración, usando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica única, y la administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferentemente hay un período de tiempo mientras que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

También puede ser conveniente combinar la administración del anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo, con la administración de un anticuerpo o un fragmento del mismo dirigido contra otro antígeno asociado a un tumor. El otro anticuerpo en este caso puede, por ejemplo, unirse al EGFR, ErbB3, ErbB4 o al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

En un aspecto, el tratamiento de la presente invención implica la administración combinada de un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, incluida la administración conjunta de cócteles de diferentes agentes quimio terapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos preferentes incluyen taxanos (tales como paclitaxel y docetaxel) y/o antibióticos de antraciclina. Los programas de preparación y dosificación para tales agentes quimioterapéuticos pueden usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante o según lo determine empíricamente el médico experto. Los programas de preparación y dosificación para dicha quimioterapia también se describen en Servicio de quimioterapia Ed., MC Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland. (1992). El anticuerpo puede combinarse con un compuesto antihormonal, por ejemplo, un compuesto antiestrógeno como el tamoxifeno, una antiprogesterona como la onapristona (véase EP616812), o un antiandrógeno como la flutamida, en dosis conocidas para tales moléculas. Cuando el cáncer a tratar es un cáncer independiente de la hormona, el paciente puede haberse sometido previamente a una terapia antihormonal y, después de que el cáncer se vuelve independiente de la hormona, el anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo (y opcionalmente otros agentes como se describe en la presente memoria) puede administrarse al paciente.

En algunos casos, puede ser beneficioso coadministrar también un cardioprotector (para prevenir o reducir la disfunción miocárdica asociada con la terapia) o una o más citocinas al paciente. También puede coadministrarse un fármaco dirigido a EGFR o un agente antiangiogénico. Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente puede someterse a extracción quirúrgica de células cancerosas y/o radioterapia.

Ejemplos

Ejemplo 1: Desarrollo de una formulación líquida

El propósito de este trabajo fue determinar las principales condiciones de formulación que tienen un impacto en la estabilidad del anticuerpo anti-HER2 en una formulación líquida, que puede usarse como base para una formulación liofilizada del anticuerpo.

Materiales y procedimientos generales

El anticuerpo anti-HER2 se produjo en biorreactores de onda y capturado por la proteína A utilizando MabSelect Sure (GE Healthcare; www.gelifesciences.com). El producto se purificó mediante cromatografía preparativa de exclusión por tamaño utilizando la columna HiLoad 16/60 Sephadex 200pg, 120ml (GE Healthcare) con el tampón en marcha citrato 10 mM pH 5,5. El producto se concentró a 50 mg/ml mediante UFDF antes de la adición de excipientes. CEX-HPLC se realizó con una columna Bakerbond Wide-Pore CBX 5µm 4,6x250mm 300A (JT Baker 7114-00; www.jtbaker.nl) seguido de SEC-HPLC usando la columna BioSep S3000 300mm x 4,6mm, 300A, intervalo de separación: 5-500 kDa (Phenomenex 00H-2146-E0; www.phenomenex.com).

Los siguientes productos químicos se utilizaron en el cribado de la formulación: trihidrato de acetato de sodio (Merck; www.merckmillipore.com), ácido acético (Sigma; www.sigmaaldrich.com), citrato de sodio (Sigma), sulfato de amonio (Fluka; www.sigmaaldrich.com), cloruro de sodio (Merck), ácido clorhídrico al 37 % (Sigma) e hidróxido de sodio al 50 % (Sigma). Se utilizaron los siguientes excipientes en el cribado de la formulación: Tween80™ (VWR; <https://uk.vwr.com>), sorbitol (Sigma), PEG8000 (Sigma), glicerol (VWR prolabo), sacarosa (Sigma), manitol (Merck) y glicina (Merck), y el amino ácidos: glutamina (Fluka), prolina (Merck), leucina (Merck), ácido aspártico (Merck), metionina (Sigma) e histidina (Sigma). Todos los productos químicos y excipientes utilizados durante estos cribados fueron de grado de farmacopea (EE. UU. O EP), excepto la solución de hidróxido de sodio al 50 %, y son adecuados como parenterales. El tampón y los excipientes se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm antes de su uso.

1.1: Cribado 1

Objetivo: Las condiciones ensayadas fueron: pH, concentración de tampón, concentración de tonicificador, concentración de tensioactivo, aminoácidos y polioles.

Materiales y procedimientos El anticuerpo anti-HER2 se preparó como se detalla anteriormente en la sección Materiales y procedimientos generales. Las muestras formuladas del anticuerpo anti-HER2 se incubaron a 5±3 °C en un cuarto frío, a 22±5 °C (temperatura ambiente del laboratorio, temperatura no controlada) y a 37±1 °C en una incubadora de cultivo celular (Hera Cell 150, Thermo (R-022) o equivalente). El intercambio de tampones para las muestras concentradas de anticuerpos anti-HER2 de 50 mg/ml se realizó con columnas PD-10 (GE Healthcare). Las condiciones de formulación fueron: pH 5,00 a 8,00, concentración del tampón de 10 a 50 mM, concentración de aminoácidos de 0 a 20 g/L, tipo de aminoácido (glutamina, prolina, leucina, ácido aspártico), sacarosa de 0 a 10 g/L, (NH₄)₂SO₄ concentración de 0 a 15 g/L y concentración de Tween 80™ de 0 a 0,01 %. Los tampones probados fueron: acetato intervalo de pH 3,7-5,7; histidina intervalo de pH 5,0-7,0; citrato intervalo de pH 5,4-7,4 y fosfato intervalo de pH 6,2-8,2. El volumen final del anticuerpo anti-HER2 se ajustó para alcanzar la concentración objetivo de 21 mg/ml.

Procedimiento: El anticuerpo anti-HER2 se formuló a la concentración objetivo de 21 g/L en 32 formulaciones diseñadas en el software estadístico JMP® (SAS). Las muestras se incubaron a 37±1 °C durante 1 mes y se analizaron por SEC-HPLC y CEX-HPLC. Se utilizó un diseño de enfoque experimental con el software estadístico JMP®. La Tabla 1 a continuación muestra el tampón, el intervalo de pH y las concentraciones de tampón analizadas.

Resultados: La fragmentación y la agregación fueron visibles en la mayoría de las muestras; sin embargo, el único parámetro que tuvo un impacto importante en la estabilidad del producto fue el pH. En el intervalo de pH de 5,00 a 6,00, más preferentemente alrededor de pH 5,50, se obtuvo la proporción máxima de anticuerpo anti-HER2 no desamidado. Este intervalo de pH (pH 5,00 a 6,00) se usó en los experimentos adicionales detallados en la presente memoria.

Tabla 1: Diseño JMP para la primera etapa de cribado. El diseño produjo 32 condiciones con varias concentraciones de tampón en un intervalo de pH de 5,00 a 8,00

Núm.	pH	concentración del tampón (mM)	tampón
1	5,45	18,0	acetato
2	7,40	10,0	fosfato
3	5,00	10,0	acetato
4	8,00	30,0	fosfato
5	7,55	50,0	fosfato
6	8,00	10,0	fosfato
7	8,00	44,0	fosfato
8	7,70	40,0	fosfato
9	6,50	50,0	histidina
10	5,60	50,0	histidina
11	5,00	10,0	acetato
12	7,55	34,0	fosfato
13	5,45	14,0	acetato
14	8,00	18,0	fosfato
15	5,90	10,0	histidina
16	6,20	26,0	histidina
17	5,45	32,0	acetato
18	5,00	50,0	acetato
19	7,40	16,0	fosfato
20	6,80	26,0	histidina
21	5,00	16,0	acetato
22	7,40	50,0	fosfato
23	5,00	28,0	acetato
24	6,50	16,0	fosfato
25	7,25	34,0	fosfato
26	8,00	16,0	fosfato
27	5,00	44,0	acetato
28	5,45	44,0	acetato
29	6,35	44,0	histidina
30	5,60	42,0	histidina
31	8,00	50,0	fosfato
32	6,65	42,0	histidina

1.2: Cribado 2

- 5 **Objetivo:** Se evaluó la eficiencia de varios excipientes para estabilizar el producto en el intervalo de pH óptimo determinado en el cribado 1.

10 **Materiales y procedimientos:** El anticuerpo anti-HER2 se preparó como se detalla anteriormente en la sección Materiales y procedimientos generales. Las muestras formuladas del anticuerpo anti-HER2 se incubaron a 37 ± 1 °C en una incubadora de cultivo celular, Hera Cell 150, Thermo (R-022) o equivalente. El intercambio de tampón para las muestras concentradas de anticuerpos anti-HER2 de 50 mg/ml se realizó con columnas PD-10 (GE Healthcare). El volumen final se ajustó para alcanzar la concentración objetivo de 21 mg/ml. Los parámetros evaluados fueron: varias concentraciones de asparagina, sacarosa, PEG8000, sulfato de amonio, cloruro de sodio, glutamina, etanol y Tween 80™.

15

Procedimiento: El anticuerpo anti-HER2 se formuló a la concentración objetivo de 21 g/L o 50 g/L. Las formulaciones ensayadas se muestran en la Tabla 2 dada a continuación. Se probaron varios excipientes para su eficiencia en la estabilización del producto. Las muestras fueron estresadas mediante un estudio acelerado a 37 °C durante un mes y analizadas por SEC-HPLC y CEX-HPLC.

Resultados: La Figura 1a muestra que las variaciones de la velocidad de desamidación de las formulaciones fueron pequeñas. En el momento 0, el producto tenía el 75 % de la forma no desamidada y después de un mes a 37 °C, todas las muestras tenían del 36 % al 43 % de la forma no desamidada. La formulación del anticuerpo anti-HER2 a una alta concentración en presencia de una alta concentración de Tween80™ o en una alta concentración de sal produjo los mejores resultados de desamidación. Las Figuras 1b, c y d muestran que las condiciones que producen la desamidación más baja producen los niveles de agregación más altos y también la pérdida más alta de solubilidad de los anticuerpos. En conclusión, fue posible reducir la velocidad de desamidación a un grado bajo mediante el uso de composiciones de formulación extremas. Estos incluyeron altas concentraciones de proteína, sal y tensioactivo. Las mejores condiciones produjeron un aumento del 6 % de la forma no desamidada; sin embargo, las mismas condiciones produjeron la mayor proporción de agregación y una importante pérdida de solubilidad.

Tabla 2: Todas las muestras estaban en citrato 10 mM, pH 5,5 y NaCl 50 mM, a las que se añadieron varios excipientes. El anticuerpo se formuló a 21 g/L o 50 g/L.

Muestra núm.	Composición Base	Composición de la formulación	Concentración de Mab (g/L)
1	10 mM citrato pH 5,5 50 mM NaCl (todas las composiciones)	Sacarosa 1 g/L	21
2		Sacarosa 5 g/L	21
3		Sacarosa 10 g/L	21
4		Sacarosa 25 g/L	21
5		Glicerol 1 %	21
6		Glicerol 5 %	21
7		Glicerol 10 %	21
8		Glicerol 25 %	21
9		PEG8000 3 %	21
10		PEG8000 1,5 %	21
11		NaCl 50 mM	50
12		NaCl 100 mM	50
13		NaCl 100 mM	21
14		NaCl 250 mM	21
15		NaCl 500 mM	21
16		(NH ₄) ₂ SO ₄ 100 mM	21
17		Etanol 1 %	21
18		Etanol 5 %	21
19		Etanol 10 %	21
20		Tween80 al 0,01 %	21
21		Tween80 al 0,1 %	21
22		Tween80 al 1,0 %	21
23		Tween80 al 2,5 %	21
24		Asparagina 1 g/L	21
25		Asparagina 5 g/L	21
26		Asparagina 10 g/L	21
27		Glutamina 1 g/L	21
28		Glutamina 5 g/L	21
29		Glutamina 10 g/L	21

1.3: Cribado 3

Objetivo: El objetivo de este cribado fue reducir la desamidación de un anticuerpo anti-HER2 ajustando los mejores parámetros del experimento 2.

Materiales y procedimientos: El anticuerpo anti-HER2 se preparó como se detalla anteriormente en la sección Materiales y procedimientos generales. Para estudios acelerados, las muestras de anticuerpos anti-HER2 formuladas se incubaron a 37 ± 1 °C en una incubadora de cultivo celular, Hera Cell 150, Thermo (R-022) o equivalente. Los parámetros probados fueron: pH 4,00 a pH 6,00, los tipos de tampón fueron acetato o citrato y la concentración de sal fue de 100 mM o 250 mM. Las condiciones se detallan en la Tabla 3 dada a continuación. A partir de una muestra inicial, se añadieron 84 mg/ml de soluciones concentradas de NaCl y tampón para alcanzar las concentraciones deseadas. El volumen final se ajustó para alcanzar las concentraciones objetivo de 21 mg/ml, 42 mg/ml o 63 mg/ml de anticuerpo anti-HER2.

Procedimiento: El anticuerpo anti-HER2 se formuló a las concentraciones objetivo de 21 mg/ml, 42 mg/ml o 63 mg/ml. Se evaluó la eficiencia de dos tipos de tampones con pKas ácidas para estabilizar el producto en el intervalo de pH óptimo de pH 4,00 a pH 6,00. Las muestras se estresaron durante un mes en un estudio acelerado a 37 °C y se analizaron por SEC-HPLC y CEX-HPLC.

Resultados: En los cribados anteriores se observó que los mejores resultados de estabilidad del anticuerpo anti-HER2 se obtuvieron a valores de pH ligeramente ácidos. La desamidación podría inhibirse principalmente en presencia de una mayor concentración de anticuerpos o concentración de sal. En este cribado, se evaluaron las formulaciones del anticuerpo anti-HER2 a altas concentraciones de anticuerpos o concentraciones de sal y a un pH ligeramente ácido. En el momento 0, el producto tenía un 75 % de forma no desamidada. En la Figura 2a, los resultados de CEX-HPLC mostraron que el porcentaje máximo de forma no desamidada se redujo al 45 %. La desamidación fue más importante con los valores de pH muy bajos y se encontró un pH óptimo en el intervalo de pH 5,0 a pH 6,0. El grado de desamidación a pH bajo se redujo cuando el tampón era acetato en lugar de citrato. El NaCl a una alta concentración (250 mM) redujo la desamidación a bajos valores de pH. La alteración de la concentración del anticuerpo anti-HER2 en las formulaciones no tuvo impacto en los resultados.

Los resultados de SEC-HPLC (Figuras 2b, c, d y e) mostraron una degradación máxima a bajos valores de pH y altas concentraciones de sal. A pH 4,0 y pH 4,5 hubo cantidades mínimas de forma monomérica de anticuerpos, alta agregación y alta fragmentación. Estas degradaciones de pH bajo fueron más pronunciadas cuando el tampón era acetato. Los mejores resultados se obtuvieron a pH 5,5 y pH 6,0, donde se encontró que el acetato y el citrato son equivalentes en la estabilización del anticuerpo anti-HER2. El NaCl a 250 mM produjo más degradación a valores de pH bajos que el NaCl a 100 mM. La concentración del anticuerpo anti-HER2 no produjo ninguna diferencia.

Tabla 3: Condiciones de prueba para el cribado 3 para evaluar dos tampones: citrato y acetato en un intervalo de pH de pH 4,0 a pH 6,0

Núm.	conc. anticuerpo (mg/ml)	Tampón	pH	NaCl (mM)
1	21	Citrato 10 mM	4,0	100
2	21		4,5	100
3	21		5,0	100
4	21		5,5	100
5	21		6,0	100
6	42	Citrato 10 mM	4,0	100
7	42		4,5	100
8	42		5,0	100
9	42		5,5	100
10	42		6,0	100
11	63	Citrato 10 mM	4,0	100
12	63		4,5	100
13	63		5,0	100
14	63		5,5	100
15	63		6,0	100
16	21	acetato 10 mM	4,0	100
17	21		4,5	100
18	21		5,0	100
19	21		5,5	100
20	21		6,0	100
21	42	acetato 10 mM	4,0	100
22	42		4,5	100
23	42		5,0	100
24	42		5,5	100
25	42		6,0	100
26	63	acetato 10 mM	4,0	100
27	63		4,5	100
28	63		5,0	100
29	63		5,5	100
30	63		6,0	100
31	21	Citrato 10 mM	4,0	250
32	21		4,5	250
33	21		5,0	250
34	21		5,5	250
35	21		6,0	250
36	42	Citrato 10 mM	4,0	250
37	42		4,5	250
38	42		5,0	250
39	42		5,5	250
40	42		6,0	250

En conclusión, el parámetro más importante que impactó la formulación fue el pH de la muestra. El mejor intervalo de pH para la estabilidad se encontró en el intervalo de pH 5,5 y pH 6,0. La concentración de anticuerpos no produjo una diferencia significativa en la desamidación.

1.4: Cribado 4

Objetivo: El objetivo de esta etapa era definir una formulación líquida final que pudiera usarse como base para la formulación liofilizada. La primera etapa consistió en reducir los mejores parámetros a su intervalo óptimo. La segunda etapa fue el diseño de un experimento utilizando software estadístico para seleccionar una composición final única para la formulación líquida de anticuerpo anti-HER2.

Materiales y procedimientos: El anticuerpo anti-HER2 se preparó como se detalla anteriormente en la sección Materiales y procedimientos generales. Para estudios acelerados, las muestras formuladas del anticuerpo anti-HER2 se incubaron a 5 ± 3 °C en un cuarto frío, a 22 ± 5 °C (temperatura ambiente del laboratorio, temperatura no controlada) y 37 ± 1 °C en una incubadora de cultivo celular, Hera Cell 150, Thermo (R-022) o equivalente. El software estadístico utilizado fue JMP® (SAS).

Procedimiento: Se realizaron cribados preliminares para reducir los parámetros para el diseño experimental. El cribado del tampón se realizó dializando el anticuerpo anti-HER2 en NaCl 50 mM con la adición de acetato o citrato a pH 5,5 a las siguientes concentraciones: 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 y 20,0 mM. La concentración óptima de sal se determinó dializando el anticuerpo anti-HER2 en citrato 10 mM pH 5,5 con la adición de las siguientes concentraciones de NaCl: 0, 10, 50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1.000 mM. La metionina antioxidante se probó a las concentraciones de 1, 4 u 8 mM en el anticuerpo anti-HER2 dializado en citrato 5 mM pH 5,5, NaCl 50 mM. El experimento se realizó de acuerdo con un diseño estadístico. Los intervalos de los parámetros utilizados en el software estadístico JMP® fueron: pH 5,50 a pH 6,25, concentración de tampón de 0 a 20 mM, concentración de NaCl de 50 mM a 250 mM, un poliol (sorbitol, glicerol o ninguno), un aminoácido (prolina, glicina o ninguno), Tween80™ 0 % o 0.01 %, metionina a 0 mM o 4 mM. El diseño del enfoque experimental se muestra en la Tabla 4 dada a continuación.

Tabla 4: Diseño de software estadístico JMP® para el experimento. El diseño produjo 24 condiciones.

Núm.	NaCl (mM)	Acetato (mM)	pH	Azúcar (5 %)	Aminoácido (20 g/L)	Tween80® %	Metionina (mM)
1	50	15,3	6,0	Sorbitol	ninguno	0,010	0
2	230	7,7	6,1	Sorbitol	Pro	0,010	4
3	50	1,0	6,2	Glicerol	ninguno	0,000	0
4	180	7,7	5,9	Glicerol	Gly	0,000	0
5	120	7,7	5,7	Glicerol	Gly	0,010	4
6	250	11,5	5,6	ninguno	Gly	0,010	4
7	120	13,4	5,6	Sorbitol	ninguno	0,000	4
8	180	1,0	5,9	Sorbitol	Pro	0,000	4
9	150	2,9	5,5	ninguno	ninguno	0,000	0
10	250	20,0	6,2	Sorbitol	Gly	0,000	4
11	220	20,0	6,0	ninguno	Pro	0,010	0
12	50	5,8	5,4	Glicerol	Pro	0,010	4
13	80	20,0	5,7	ninguno	ninguno	0,010	4
14	250	2,9	5,7	ninguno	ninguno	0,000	0
15	230	15,3	5,6	Glicerol	Gly	0,000	0
16	190	13,4	5,6	Sorbitol	Pro	0,010	0
17	70	12,4	5,5	Sorbitol	Gly	0,000	4
18	70	18,1	6,2	ninguno	Pro	0,000	0
19	140	18,1	5,9	ninguno	Gly	0,010	4
20	250	18,1	6,2	Sorbitol	Gly	0,010	0
21	50	20,0	6,0	Glicerol	Pro	0,000	4
22	240	1,0	6,2	Glicerol	ninguno	0,010	4
23	80	3,9	6,1	ninguno	Gly	0,000	4
24	70	17,2	5,5	Sorbitol	Gly	0,010	0

Resultados: Los resultados se muestran en la Figura 3 y la Tabla 5. La Figura 3a muestra que la agregación y la fragmentación aumentaron a concentraciones de NaCl superiores a 200 mM. La Figura 3b muestra que la proporción de formas no desamidadas fue más baja a NaCl 0 mM a 50 mM y después aumentó linealmente con la concentración de sal. La Figura 3c mostró que a pH 5,5, un tampón de acetato dio como resultado menos fragmentos y agregados. La metionina antioxidante no tuvo impacto en la estabilidad del anticuerpo anti-HER2.

Tabla 5: Anticuerpo anti-HER2 formulado con un antioxidante: porcentaje de monómeros, agregación, fragmentación y forma no desamidada

Metionina (mM)	Conc (mg/ml)	% monómero	% dímero	% fragmento	% no desamidado
0,0	17,828	98,56	0,86	0,37	42,16
1,0	18,230	98,83	0,61	0,36	42,03
4,0	18,473	98,74	0,87	0,39	41,50
8,0	18,374	98,56	0,81	0,39	41,24

Por lo tanto, para el diseño experimental final, se decidió incluir NaCl en un intervalo de 50 mM a 250 mM y un tampón de acetato en un intervalo de 1,0 mM a 20,0 mM. También se incluyó una concentración única de metionina a una concentración de 4,0 mM.

La composición de formulación líquida final del anticuerpo anti-HER2 se determinó en un experimento usando el software estadístico JMP® como se muestra en la Tabla 4. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 1 mes y se analizaron por SEC-HPLC y CEX-HPLC. Los resultados se ingresaron en el software estadístico, que detectó significación estadística ($P < 0.05$) para el porcentaje de monómeros, porcentaje de agregados y concentración del producto (resultados no mostrados). Las respuestas fueron de excelente calidad con R cuadrados de 1,00, poca probabilidad de rechazo erróneo de la hipótesis nula ($P < 0.05$) y valores pequeños de RMSE. La respuesta de los fragmentos tuvo un R cuadrado de 0,94 pero los valores RMSE y P fueron grandes. El porcentaje de fragmentos no tenía una relación estadísticamente significativa con ninguna composición de tampón.

La previsión de perfiles (resultados no mostrados) indicó que el poliol, el aminoácido, la metionina y Tween80™ tenían barras de error muy grandes y no se pudieron sacar conclusiones. El pH, la concentración de tampón y la concentración de sal tuvieron el mayor impacto en la estabilidad del producto. El pH fue óptimo para la agregación mínima en el intervalo de pH 5,9 a pH 6,1, pero el óptimo para la desamidación mínima fue de pH 5,5 a pH 5,8. La concentración óptima de NaCl para baja agregación estuvo en el intervalo de 75 mM a 175 mM y la óptima para la desamidación mínima fue de 200 mM a 225 mM. Las concentraciones óptimas de tampón predichas para una agregación mínima estaban en el intervalo de 7,5 mM a 17,5 mM y las óptimas para una desamidación mínima fueron con concentraciones de tampón inferiores a 5 mM. En resumen, las condiciones óptimas para evitar la desamidación fueron diferentes a las condiciones óptimas para evitar la agregación.

Durante los experimentos de cribado, los niveles de agregación fueron mucho más bajos que los niveles de desamidación. Después de un estudio acelerado de un mes a 37 °C a pH 5,5, la agregación en los cribados analizados anteriormente estuvo generalmente en el intervalo de 0,5 %, mientras que la forma desamidada aumentó en un 30 %. Se decidió formular en condiciones que redujeran la mayor degradación/desamidación. Por lo tanto, se decidió que la composición final contendría: acetato 4 mM pH 5,7 y NaCl 214 mM. Dado que estas condiciones son menos favorables para la solubilidad del anticuerpo anti-HER2, también se incluyó un excipiente con propiedades solubilizantes y se añadió prolina a 20 g/L a la composición final. Finalmente, aunque no se demostró, se sabe que la presencia de un tensioactivo es conveniente en una formulación para evitar la pérdida de producto debido al esfuerzo mecánico encontrado durante el transporte (Mahler HC y otros (2009) J Pharm Sci, 98(12): 4525-33) Durante los experimentos de cribado, Tween80™ a baja concentración mejoró la solubilidad y no tuvo un impacto negativo en la integridad del producto. Por lo tanto, a la composición final se añadió 0,01 % Tween80™.

El parámetro más importante para la estabilidad del anticuerpo anti-HER2 fue el pH y, por lo tanto, se eligió un tampón de acetato para la concentración final, ya que se demostró que confiere una mayor estabilidad a la formulación que un tampón de citrato (véase Fig. 3c). Las concentraciones óptimas de tónico y tampón se detectaron en el intervalo de pH óptimo. Los aminoácidos también se probaron y algunos tuvieron propiedades solubilizantes útiles para el anticuerpo anti-HER2. Los tensioactivos probados no tuvieron un impacto negativo en la estabilidad del anticuerpo anti-HER2 a concentraciones más bajas y, por lo tanto, se incluyeron en la composición final para la protección contra el esfuerzo mecánico. La composición final se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6: Formulación líquida de anticuerpos anti-HER2

Formulación líquida	
anti-HER2 Ab	21 g/L
pH	pH 5,7
tampón	acetato 4 mM
tonificante	NaCl 214 mM
tensioactivo	0,01 % Tween80™
solubilizador	20 g/L de prolina

Ejemplo 2: Desarrollo de una formulación Liofilizada

La formulación líquida del anticuerpo anti-HER2 como se determinó en el Ejemplo 1, se usó en el punto de partida para desarrollar una formulación liofilizada óptima del mismo anticuerpo. Se demostró claramente en los cribados del Ejemplo 1, que el parámetro más importante para la estabilidad de este anticuerpo anti-HER2 en la formulación fue el pH. Se encontró que el uso de un tampón de acetato en forma de acetato de sodio proporciona resultados óptimos en comparación con un tampón de citrato y, por lo tanto, el tampón de acetato se incluyó en la formulación líquida final. Para estabilizar aún más la formulación del anticuerpo anti-HER2 para la liofilización, se requirió un lioprotector. Como se detalla en la presente memoria, hay muchos tipos de lioprotectores disponibles y para los fines de este experimento, se seleccionaron inicialmente los siguientes lioprotectores: sacarosa, manitol, glucosa, sorbitol y lactosa. Sin embargo, es ampliamente conocido que la glucosa, la lactosa y el sorbitol son azúcares reductores y, por lo tanto, estos lioprotectores no se seleccionaron para un trabajo experimental adicional. Para las primeras ejecuciones, se eligió manitol como el lioprotector para la formulación liofilizada del anticuerpo anti-HER2.

Materiales y procedimientos generales

Los siguientes productos químicos se utilizaron en el cribado de la formulación: trihidrato de acetato de sodio (Merck), ácido acético (Sigma), ácido clorhídrico al 37 % (Sigma) e hidróxido de sodio al 50 % (Sigma). Se utilizaron los siguientes excipientes en el cribado de la formulación: Tween80™ (VWR), sacarosa (Sigma), manitol (Merck) y glicina (Merck). Se prepararon soluciones madre de sacarosa (600 g/L), glicina (130 g/L), manitol (150 g/L) y Tween80™ (10 %) en acetato de sodio 5,75 mM, pH 5,7. Se usaron HCl al 37 % y NaOH para el ajuste del pH. Los excipientes se agregaron después a la formulación de anticuerpo anti-HER2 por dilución de la solución madre en la formulación para lograr la concentración deseada. Las especificaciones para el tampón fueron 5,7±0,1 para el pH y 0,42 a 0,66 mS/cm para la conductividad. Se usó agua ISO3696 Tipo II en todo momento. Esta agua altamente purificada se preparó internamente utilizando una membrana osmótica y un sistema de esterilización con ozono (Christ Aqua, Suiza). Todos los productos químicos y excipientes fueron adecuados para la administración parenteral. El tampón se filtró a través de un filtro de 0,22 µm antes de su uso.

El material de prueba de anticuerpos anti-HER2 utilizado para este estudio se purificó primero mediante cromatografía de afinidad con proteína A utilizando MabSelect Sure (GE Healthcare). Como la pureza del producto después de la proteína A era alta (contenido de monómero >99 %), no se realizaron más etapas de purificación antes de la diafiltración y concentración del producto.

El anticuerpo anti-HER2 purificado se diafiltró 7-10 veces por filtración de flujo tangencial (TFF) en acetato de sodio 5,75 mM, pH 5,7 y después se concentró a 50-60 g/L. Después de la TFF, el anticuerpo anti-HER2 se formuló mediante la adición de sacarosa, glicina y Tween80™ para alcanzar la composición tampón final de 30 g/L. El material estándar de referencia utilizado para las pruebas analíticas fue el anticuerpo DRS-anti-HER2 y se mantuvo en el Control de Calidad a una temperatura inferior a -60 °C.

Para preparar el producto farmacológico liofilizado, se usó un sistema de liofilización Telstar (liofilizador Lyobeta 15; Telstar, Tarrasa, España). Se usó una cámara de estabilidad VP600 Vötsch (Vötsch Industrietechnik GmbH, Alemania) para el ensayo de 3 meses a 40±2 °C, prueba de humedad relativa del 50±5 % y también para el ensayo de 12 meses a 25±2 °C, prueba de humedad relativa ±5 %. Se usó un refrigerador de laboratorio estándar para la estabilidad a 36 meses a 5±3 °C.

Los viales y materiales de tapón utilizados fueron aquellos destinados a la fabricación de ensayos clínicos. Los viales eran viales de vidrio Fiolax Clear de 20 ml, USP tipo I adquiridos de Schott (Art. No: 1156521) y los tapones fueron distribuidos por Flurotec por West Pharma (ref FD20TT3WRS).

La estabilidad del producto farmacológico se determinó utilizando una serie de ensayos para evaluar los cambios en el medicamento a lo largo del tiempo. CEX-HPLC (Dionax, ProPac WCX-104 x 250 mM), SEC-HPLC (Phenomenex, YARRA 3u SEC-3000 7.8 x 300 mM) y SDS-PAGE son indicadores sensibles de la descomposición del producto. El perfil del producto farmacológico que utiliza estos ensayos cambiará con el tiempo si la muestra está sujeta a degradación. El ensayo A280 puede usarse para detectar cambios en el nivel de proteína que pueden ser indicativos de descomposición del producto o adhesión a la pared del contenedor. Puede usarse un ensayo basado en células ELISA y un ensayo de unión ELISA para determinar la potencia del producto, con un cambio en la potencia de la muestra que indica el deterioro del producto. La humedad residual del producto se evaluó mediante el ensayo de Karl Fisher.

2.1: Cribado 1

Objetivo: Determinar el efecto del manitol lioprotector sobre la estabilidad de los anticuerpos

Materiales y procedimientos: Las formulaciones se prepararon de acuerdo con la sección Materiales y procedimientos generales más arriba. En este cribado se probaron dos formulaciones que contenían manitol con diferentes concentraciones de Tween80™. Los excipientes, el tampón y el anticuerpo estaban más concentrados que en la

formulación líquida (x1,43) para lograr 150mg de producto liofilizado por vial y no más de 1 cm de altura de la masa. Las formulaciones ensayadas fueron:

30 mg/ml de anticuerpo anti-HER2, acetato de sodio 5,76 mM, pH 5,7, 72 mg/ml de manitol, Tween80™ al 0,014 %; y 30 mg/ml de anticuerpo anti-HER2, acetato de sodio 5,76 mM pH 5,7, manitol 72 mg/ml, Tween80™ al 0,043 %.

El ciclo de liofilización realizado se detalla en la Tabla 7 dada a continuación y también contenía una etapa de recocido para aumentar la cristalinidad.

Tabla 7: Parámetros del ciclo de liofilización.

Etapas	Temp (°C)	Vacío (mbar)	Tiempo (h)
Congelación	5		0,15
Congelación	5		0,30
Congelación	-20		0,25
Congelación	-20		0,3
Congelación	-45		0,35
Congelación	-45		2,00
Congelación	-10		1,15
Congelación	-10		2,00
Congelación	-45		1,15
Congelación	-45		2,00
Vacío		0,1	
Secado primario	-30	0,1	1,00
Secado primario	-30	0,1	72,00
Secado secundario	25		5,00
Secado secundario	25		24,00

Resultados: El producto de partida contenía 99,8 % de monómeros después de la purificación. Después de los primeros ensayos, el producto contenía 98,0 % de monómeros (y 2,0 % de dímeros) y no se observó diferencia en el porcentaje de monómeros o dímeros con ninguna de las formulaciones. Por lo tanto, las diferentes concentraciones de Tween80™ no afectaron el porcentaje de monómeros en la formulación liofilizada. En conclusión, el primer ensayo muestra que el manitol tenía un bajo efecto crioprotector (disminución del contenido de monómero). Por lo tanto, se realizará un estudio de descongelación libre antes de que se ejecute la próxima liofilización para seleccionar excipientes en función de sus capacidades crioprotectoras. Dado el efecto mínimo de la concentración de Tween (que se supone que previene la formación de agregados durante la reconstitución de la masa), se decidió continuar usando la concentración más baja de Tween80™ (0,014 %), en este estudio.

2.2: Cribado 2

Objetivo: Para determinar las condiciones óptimas entre la apariencia y la estabilidad de la masa, se probaron diferentes mezclas de manitol y sacarosa durante cinco ciclos de congelación-descongelación.

Materiales y procedimientos: Las formulaciones se prepararon de acuerdo con la sección Materiales y procedimientos generales más arriba. Las formulaciones ensayadas se muestran en la Tabla 9 dada a continuación y se sometieron a cinco ciclos de congelación-descongelación a -40 °C y 25 °C. Las formulaciones con los porcentajes más altos de monómeros se seleccionaron para liofilización utilizando el ciclo de liofilización como se detalla en la Tabla 7. Después de la liofilización, las masas se reconstituyeron y se determinó el porcentaje de monómeros para cada formulación.

Resultados: Los resultados de cinco ciclos de congelación-descongelación se muestran en la Figura 4. Las formulaciones 6, 8, 10 y 19 se seleccionaron para liofilización ya que estas formulaciones tenían los porcentajes más altos de monómeros presentes después de la congelación-descongelación. Después de la liofilización, la formulación 10 mostró la mejor apariencia de masa (resultados no mostrados). Después de la reconstitución de las masas, se determinó el porcentaje de monómeros y los resultados se muestran en la Figura 5. En conclusión, una combinación de los lioprotectores manitol y sacarosa impartió buena estabilidad en la formulación liofilizada del anticuerpo anti-HER2; sin embargo, las formulaciones liofilizadas tenían un aspecto de masa pobre. Para probar la estabilidad de la formulación mejorada sobre estos resultados, se decidió probar una concentración más alta de sacarosa. Además, para intentar mejorar el aspecto de la masa, se decidió probar la adición del agente de carga glicina a la formulación.

Tabla 8: Formulaciones de manitol/sacarosa sometidas a cinco ciclos de congelación-descongelación

No	Tampón	Manitol %	Sacarosa %	Tween80™ %
1	5,76 mM acetato de sodio pH 5,7	6	0	0,014
2		4	0	0,014
3		2	0	0,014
4		0	4	0,014
5		0	6	0,014
6		1	6	0,014
7		1	4	0,014
8		2	6	0,014
9		2	4	0,014
10		4	6	0,014
11		4	4	0,014
12		6	0	0,043
13		4	0	0,043
14		2	0	0,043
15		0	4	0,043
16		0	6	0,043
17		1	6	0,043
18		1	4	0,043
19		2	6	0,043
20		2	4	0,043
21		4	6	0,043
22		4	4	0,043

2.3: Cribado 3

Objetivo: Determinar la humedad y la apariencia de la masa de la formulación preferente que comprende 4 % de manitol y 6 % de sacarosa del Cribado 2 y también para probar concentraciones más altas de ambos lioprotectores para establecer si el aspecto de la masa podría mejorarse. Además, se probó el efecto de una mezcla de manitol y glicina sobre la estabilidad de las formulaciones.

Materiales y procedimientos: Las formulaciones se prepararon de acuerdo con la sección Materiales y procedimientos generales más arriba. Las formulaciones ensayadas se muestran en la Tabla 9 dada a continuación y se sometieron a liofilización de acuerdo con los parámetros de la Tabla 7.

Tabla 9: Formulaciones de manitol/sacarosa/glicina sometidas a liofilización

Núm.	Tampón	Manitol %	Sacarosa %	Glicina mM	Tween80™ %
1	5,76 mM acetato de sodio pH 5,7	4	6	0	0,014
2		6	6	0	0,014
3		0	6	0	0,014
4		0	8	0	0,014
5		0	10	0	0,014
6		0	12	0	0,014
7		5,6	0	3	0,014

Resultados: El porcentaje de humedad y la apariencia de la masa se describen en la Tabla 10 dada a continuación para cada formulación ensayada. Las formulaciones 1, 2 y 7 mostraron una buena apariencia de masa; sin embargo, la formulación 2 tuvo el mayor contenido de humedad. Las formulaciones 3-6, que contenían solo sacarosa tenían una apariencia de masa encogida y agrietada, aunque esto se redujo a las concentraciones más altas de sacarosa de 10 y 12 % (datos no mostrados).

Tabla 10: Contenido de humedad y apariencia de la masa de las siete formulaciones ensayadas

Núm.	Humedad %	Apariencia de masa
1	0,49	Bueno, sin contracción, sin grietas
2	0,80	Bueno, sin contracción, sin grietas
3	0,60	Contracción y agrietamiento
4	0,59	Contracción y agrietamiento
5	0,45	Contracción y agrietamiento
6	0,55	Contracción y agrietamiento
7	0,38	Bueno, sin contracción, sin grietas

2.4: Cribado 4

Objetivo: El objetivo de este cribado fue determinar la estabilidad de una formulación del anticuerpo anti-HER2 que contiene manitol, glicina y Tween80™ como excipientes. Las formulaciones se someterían primero a cinco ciclos de congelación-descongelación y las formulaciones más estables se seleccionarían para una liofilización adicional.

Materiales y procedimientos: Las formulaciones se prepararon de acuerdo con la sección Materiales y procedimientos generales más arriba. Las formulaciones ensayadas se muestran en la Tabla 11 dada a continuación y se sometieron a cinco ciclos de congelación-descongelación a -40 °C y 25 °C.

Tabla 11: Formulaciones de manitol/glicina sometidas a cinco ciclos de congelación-descongelación

Núm.	Tampón	Manitol %	Glicina %	Tween80™ %
1	5,76 mM acetato de sodio pH 5,7	2	0,022	0,014
2		4	0,022	0,014
3		6	0,022	0,014
4		2	0,400	0,014
5		4	0,400	0,014
6		6	0,400	0,014
7		2	0,600	0,014
8		4	0,600	0,014
9		6	0,600	0,014
10		2	1,000	0,014
11		4	1,000	0,014
12		6	1,000	0,043

Resultados: La estabilidad de las 12 formulaciones del anticuerpo anti-HER2 probado en cinco ciclos de congelación-descongelación se muestra en la Figura 6, como el porcentaje de monómero presente. Se observó durante este estudio, que la relación de manitol:glicina parecía ser importante para la estabilización del anticuerpo anti-HER2. Las formulaciones 1, 4, 7, 10 y 11 se seleccionaron para liofilización adicional ya que las proporciones de manitol: glicina usadas tuvieron poco efecto sobre la estabilidad de la formulación antes y después de cinco ciclos de congelación-descongelación.

2.5: Cribado 5

Objetivo: Dado que se observaron buenos resultados iniciales de estabilidad con las formulaciones de manitol/glicina sometidas a ciclos de congelación-descongelación en el cribado 4, se decidió probar una mezcla de formulaciones de sacarosa/glicina y formulaciones de alta concentración de sacarosa junto con las formulaciones seleccionadas de manitol/glicina en una liofilización ciclo.

Materiales y procedimientos: Las formulaciones se prepararon de acuerdo con la sección Materiales y procedimientos generales más arriba. Las formulaciones ensayadas se muestran en la Tabla 12 dada a continuación y se sometieron a liofilización de acuerdo con los parámetros de la Tabla 7.

Tabla 12: Concentraciones de los excipientes probados en un ciclo de liofilización en el cribado 5

Núm.	Tampón	Manitol %	Sacarosa %	Glicina %	Tween80™ %
1		0	10	0	0,014
2		0	12	0	0,014
3		0	10	0,4	0,014
4		0	10	0,6	0,014
5		0	10	1,0	0,014
6		0	12	0,4	0,014
7		0	12	0,6	0,014
8		0	12	1,0	0,014
9	5,76 mM acetato de sodio pH 5,7	1	10	0	0,014
10		2	10	0	0,014
11		4	10	0	0,014
12		1	12	0	0,014
13		2	12	0	0,014
14		4	12	0	0,014
15		2	0	0,4	0,014
16		2	0	0,6	0,014
17		2	0	1,0	0,014
18		4	0	1,0	0,014

Resultados: La estabilidad de las 12 formulaciones de anticuerpo anti-HER2 ensayadas en cinco ciclos de congelación-descongelación se muestra en la Figura 7 como el porcentaje de monómero presente. También se evaluó la apariencia de la masa (resultados no mostrados) y las siete formulaciones 4, 8, 10, 12, 15-17, que mostraron la mejor estabilidad y apariencia de la masa, se seleccionaron para un estudio de estabilidad de un mes a 40 °C.

2.5: Cribado 6

Objetivo: Determinar la estabilidad a 40 °C durante 1 mes de siete formulaciones de anticuerpos anti-HER2 liofilizados.

Materiales y procedimientos: Las formulaciones se prepararon de acuerdo con la sección Materiales y procedimientos generales más arriba. Siete formulaciones que contienen los excipientes enumerados en la Tabla 13 se sometieron a un ciclo de liofilización de acuerdo con los parámetros establecidos en la Tabla 14.

Tabla 13: Composición de las formulaciones sometidas al ciclo de liofilización.

Núm.	Tampón	Manitol %	Sacarosa %	Glicina %	Tween80™ %
1	5,76 mM acetato de sodio pH 5,7	0	10	0,6	0,014
2		0	12	1,0	0,014
3		2	10	0,0	0,014
4		1	12	0,0	0,014
5		2	0	0,4	0,014
6		2	0	0,6	0,014
7		2	0	1,0	0,014

Tabla 14: Parámetros del ciclo de liofilización.

Etapas	Temp (°C)	Vacío (mbar)	Tiempo (h)
Congelación	5		0,20
Congelación	5		0,30
Congelación	0		0,05
Congelación	0		0,30
Congelación	-45		0,45
Congelación	-45		2,00
Congelación/recocido	-15		0,30
Congelación/recocido	-15		2,00
Congelación	-45		0,30
Congelación	-45		2,00
Vacío		0,1	
Secado primario	-30	0,1	1,00
Secado primario	-30	0,1	72,00
Secado secundario	25		5,00
Secado secundario	25		24,00

Resultados: Los resultados del estudio de estabilidad a 40 °C durante un mes se pueden ver en las Figuras 8a, 8b y 8c. Las formulaciones 1-4 mostraron un alto porcentaje de monómeros después de un mes (Figura 8a), así como también perfiles CEX similares (Figura 8b). Se demostró que el porcentaje de humedad medido en las masas liofilizadas era el más bajo para las formulaciones 1-4. En base a estos resultados, las formulaciones 2 y 4 se seleccionaron para su uso en cribados adicionales.

2.7: Cribado 7

Objetivo: Para optimizar el ciclo de liofilización y mejorar la apariencia de la masa al reducir la grieta y la contracción observadas durante el secado secundario.

Materiales y procedimientos: Las formulaciones 2 y 4 se seleccionaron del Cribado 6 y se enviaron a Telstar (Terrassa, España) para la determinación de la temperatura de colapso (Tg').

La etapa de secado secundario del ciclo de liofilización se examinó para tratar de mejorar la apariencia de la masa y reducir el porcentaje de humedad en las masas. Se probaron dos nuevos protocolos de liofilización en los que la etapa de secado secundario se ralentizó. Con referencia a la Tabla 14, el tiempo para los dos pasos de secado secundarios se alteró en un ciclo de 5 y 24 horas a 15 y 9 horas, respectivamente, y en un segundo ciclo de 5 y 24 horas a 20 y 4 horas respectivamente, mientras que se mantuvo una presión de vacío de 0,1 bares en todas las etapas de secado secundario.

Resultados: Las temperaturas de colapso de las dos formulaciones ensayadas se muestran en la Tabla 15 a continuación, junto con la composición de las formulaciones. Se consideró que ambas formulaciones tenían temperaturas de colapso muy similares.

Tabla 15: Formulaciones seleccionadas y su temperatura de colapso

Núm.	Tampón	Manitol %	Sacarosa %	Glicina %	Tween80™ %	Tg' °C
1	5,76 mM acetato de sodio pH 2	2	10	0	0,014	-31
2	5,7	0	12	1	0,014	-32

Después de la liofilización con una etapa de secado secundario de 15 y 9 horas, se determinó que el contenido de humedad era 0,94 % para la formulación 1 y 1,19 % para la formulación 2. Después de la liofilización con una etapa de secado secundario de 20 y 4 horas, se determinó que el contenido de humedad era 1,20 % para la formulación 1 y 1,70 % para la formulación 2.

2.8: Cribado 8

Objetivo: Para determinar la estabilidad a 40 °C durante un mes de las dos formulaciones liofilizadas de anticuerpos anti-HER2 seleccionadas. Este estudio es el mismo que el estudio de estabilidad de un mes descrito en la sección 2,6 para el Cribado 6, pero se repite debido a los cambios en el ciclo de liofilización descritos en la sección 2,7 anterior.

- 5 **Materiales y procedimientos:** La composición de las formulaciones 1 y 2 se muestra en la Tabla 16 dada a continuación. Ambas formulaciones se sometieron al ciclo de liofilización que se muestra en la Tabla 17 dada a continuación, donde se eligió el tiempo de secado secundario de 20 y 4 horas. Las muestras fueron analizadas por SEC y CEX después de uno y dos meses de almacenamiento a 40 °C.

10 Tabla 16: Composición de las formulaciones 1 y 2

Núm.	Tampón	Manitol Sacarosa %	Glicina %	Tween80™ %
1	5,76 mM acetato de sodio pH 5,7	2 10	0	0,014
2		0 12	1	0,014

20 Tabla 17: Parámetros optimizados del ciclo de liofilización

Etapas	Temp (°C)	Vacío (mbar)	Tiempo (h)
Congelación	5		0,20
Congelación	5		0,30
Congelación	0		0,05
Congelación	0		0,30
Congelación	-45		0,45
Congelación	-45		2,00
Congelación/recocido	-15		0,30
Congelación/recocido	-15		2,00
Congelación	-45		0,30
Congelación	-45		2,00
Vacío		0,1	
Secado primario	-30	0,1	1,00
Secado primario	-30	0,1	72,00
Secado secundario	25	0,1	20,00
Secado secundario	25	0,1	4,00

Resultados: El porcentaje de monómeros en ambas formulaciones candidatas después de uno y dos meses, medido por HPLC-SEC, puede verse en la Figura 9a. Los resultados de HPLC-CEX se muestran en la Figura 9b. En el tiempo 0, para las formulaciones líquidas y liofilizadas, hay poca diferencia en la estabilidad para las formulaciones 1 y 2. Después de un mes de almacenamiento a 40 °C, no hay diferencia entre las formulaciones después de HPLC-CEX; sin embargo, hay una pequeña diferencia mostrada por HPLC-SEC en la Figura 9a. Puede verse claramente en las Figuras 9a y 9b que después de dos meses de almacenamiento, la Formulación 2 es más estable que la Formulación 1. Se eligió la formulación 2 para su uso en un estudio de estabilidad a largo plazo.

50 Ejemplo 3 - Estudio de estabilidad a largo plazo

Objetivo: El propósito de este estudio de estabilidad fue determinar la estabilidad de la formulación del anticuerpo anti-HER2 liofilizado a una concentración objetivo de 30 g/L, para el almacenamiento previsto a 5±3 °C, un estudio acelerado a 25±2 °C y un estudio de estrés 40±2 °C. Se seguirá la estabilidad de la formulación de anticuerpo anti-HER2 liofilizada durante 36 meses a 5±3 °C, 12 meses a 25±2 °C y 3 meses a 40±2 °C.

Materiales y procedimientos: El tampón de formulación fue acetato de sodio 5,75 mM pH 5,7 (Merck), sacarosa al 12 % (Sigma), glicina al 1 % (Merck) y Tween80™ al 0,014 % (VWR). Se usó ácido clorhídrico al 37 % (Sigma) para ajustar el pH. Las especificaciones para el tampón fueron 5,7±0,1 para el pH y 0,42 a 0,66 mS/cm para la conductividad. Todos los productos químicos fueron adecuados para la administración parenteral. Luego se filtró el tampón a través de un filtro de 0,22 µm en una bolsa.

Se prepararon soluciones madre de las tres familias de excipientes, lioprotector (sacarosa), agente de carga (glicina) y tensioactivo (Tween80™) en tampón de acetato de sodio 5,75 mM, pH 5,7. Se prepararon soluciones madre de sacarosa, glicina y Tween80™ a concentraciones de 600 g/L, 130 g/L y 100 g/L, respectivamente. Los excipientes se

agregaron después a la formulación de anticuerpo anti-HER2 por dilución de la solución madre en la formulación para lograr la concentración deseada.

El anticuerpo anti-HER2 purificado se diafiltró 7-10 veces por filtración de flujo tangencial (TFF) en acetato de sodio 5,75 mM, pH 5,7 y después se concentró a 50-55 g/L. Después de TFF, el anticuerpo anti-HER2 se formuló mediante la adición de sacarosa, glicina y Tween80™ para alcanzar la composición tampón final. El estándar de referencia utilizado fue el anticuerpo DRS-anti-HER2-01 utilizado para las pruebas analíticas y mantenido bajo control de calidad a una temperatura inferior a -60 °C.

Para preparar el producto farmacológico liofilizado, se usó un sistema de liofilización Telstar (liofilizador Lyobeta 15; Telstar, Terrassa, España). Se utiliza una cámara de estabilidad VP600 Vötsch (Vötsch Industrietechnik GmbH, Alemania) para el estudio de 3 meses a 40±2 °C, prueba de humedad relativa de ±5 % y también para el estudio de 12 meses a 25±2 °C, prueba de humedad relativa de ±5 %. Se utiliza un refrigerador de laboratorio estándar para la estabilidad de 36 meses a 5±3 °C.

Los viales y materiales de tapón utilizados fueron aquellos destinados a la fabricación de ensayos clínicos. Los viales eran viales de vidrio Fiolax Clear de 20 ml, USP tipo I adquiridos de Schott (Art. No: 1156521) y los tapones fueron distribuidos por Flurotec por West Pharma (ref FD20TT3WRS). Todos los viales estaban engarzados.

El anticuerpo anti-HER2 formulado se dividió en alícuotas en viales de Schott de 20 ml a un volumen de 5 ml por vial. Se prepararon un total de 62 viales. El resto del estante se llenó con viales de placebo. Los viales se liofilizaron de acuerdo con los parámetros de la Tabla 18 dada a continuación.

Tabla 18: Parámetros del ciclo de liofilización para el estudio de estabilidad a largo plazo

Etapas	Temp (°C)	Vacío (mbar)	Tiempo (h)
Congelación	5		0,20
Congelación	5		0,30
Congelación	0		0,05
Congelación	0		0,30
Congelación	-45		0,45
Congelación	-45		2,00
Congelación/recocido	-15		0,30
Congelación/recocido	-15		2,00
Congelación	-45		0,30
Congelación	-45		2,00
Vacío		0,1	
Secado primario	-30	0,1	1,00
Secado primario	-30	0,1	72,00
Secado secundario	25	0,1	20,00
Secado secundario	25	0,1	4,00

La estabilidad del producto farmacológico se determinó utilizando una serie de ensayos para evaluar los cambios en el medicamento a lo largo del tiempo. CEX-HPLC (Dionax, ProPac WCX-104 x 250 mM), SEC-HPLC (Phenomenex, YARRA 3u SEC-3000 7.8 x 300 mM) y SDS-PAGE son indicadores sensibles de la descomposición del producto. El perfil del producto farmacológico que utiliza estos ensayos cambiará con el tiempo si la muestra está sujeta a degradación. El ensayo A280 puede usarse para detectar cambios en el nivel de proteína que pueden ser indicativos de descomposición del producto o adhesión a la pared del contenedor. Puede usarse un ensayo ELISA basado en células y un ensayo ELISA de unión para determinar la potencia del producto. Un cambio en la potencia de la muestra con el tiempo es indicativo del deterioro del producto. El pH de la formulación también se verificará con el tiempo para determinar la estabilidad del pH y también se supervisará el aspecto físico de la solución. También se verificará la presencia o ausencia de partículas subvisibles después de la disolución de la masa. Se monitoreará cualquier variación en la humedad del producto. Esto puede aumentar la sensibilidad del producto liofilizado a la degradación y se verificará mediante una valoración de Karl Fisher. Finalmente, se medirá el tiempo de reconstitución y se usará para determinar el tiempo de disolución completo de las masas de producto liofilizado. Estos parámetros se evaluarán de acuerdo con los criterios que se muestran en la Tabla 19 dada a continuación para los puntos de tiempo para las temperaturas 5 °C, 25 °C y 40 °C.

Tabla 19: Parámetros para evaluar la estabilidad del producto farmacológico del anticuerpo anti-HER2

Parámetro	Especificaciones
SEC - HPLC	monómero > 98 %
CEX-HPLC	comparable al estándar de referencia*
SDS-PAGE	comparable al estándar de referencia*
A280	≥ 20 y ≤ 24 mg/ml
ELISA de unión	≥ 75 % y ≤ 125 % de EC ₅₀ estándar de referencia*
pH	$\geq 5,6$ y $\leq 5,8$
Apariencia	Líquido incoloro, claro a ligeramente opalescente prácticamente libre de partículas visibles
Tiempo de Reconstitución	≤ 3 min
Partículas subvisibles	≤ 6.000 partículas $\geq 10\mu\text{m}$ /viales ≤ 600 partículas $\geq 25\mu\text{m}$ /viales
Titulación de Karl Fisher	≤ 2 %
* El estándar de referencia utilizado fue el anticuerpo DRS-anti-HER2-01	

Resultados: El porcentaje de monómeros en la formulación de anticuerpo anti-HER2 liofilizado después de 12 meses, medido por HPLC-SEC, se muestra en la Figura 10a. Esta figura muestra que no hay diferencia en el porcentaje de monómero en las muestras de formulación en todos los puntos de tiempo y a todas las temperaturas ensayadas. Los resultados de HPLC-CEX durante 12 meses se muestran en la Figura 10b. La escala grande utilizada en el eje y del gráfico da la impresión de una gran diferencia entre la estabilidad de las muestras de formulación, particularmente a 40 °C y puntos temporales posteriores; sin embargo, en realidad solo hay una diferencia como máximo de aproximadamente 1,5 % y la formulación se consideró estable durante la duración del estudio de 12 meses. Los resultados para los otros parámetros ensayados se resumen en la Tabla 20 dada a continuación, donde se indica si se cumplió la especificación para cada parámetro de evaluación.

Para la mayoría de los parámetros ensayados, se encontró que la formulación de anticuerpo anti-HER2 ensayada se encontraba dentro de las especificaciones que se dan en la Tabla 19, para todas las temperaturas y puntos de tiempo probados hasta 12 meses inclusive. Para el ensayo A280, utilizado para detectar cambios en el nivel de proteína que pueden ser indicativos de descomposición del producto o adhesión a la pared del contenedor, se calculó mal la especificación de evaluación inicial de ≥ 20 y ≤ 24 mg/ml. Al comienzo del estudio de estabilidad, el resultado para el ensayo A280 fue en realidad 18 mg/ml (ya fuera de la especificación de evaluación) y esta cifra se mantuvo igual durante todo el estudio, lo que indica que en realidad no hubo descomposición del producto o adhesión al contenedor pared. Para la evaluación del pH, se estableció la especificación de un pH de $\geq 5,6$ y $\leq 5,8$. Para las lecturas en el punto temporal de 6 meses a 5 °C y 25 °C, los valores de pH registrados fueron 5.865, solo fraccionalmente fuera del intervalo de pH establecido. En todos los demás puntos temporales y temperaturas ensayadas, las especificaciones de pH estaban dentro del intervalo establecido.

En conclusión, este estudio de estabilidad durante 12 meses demostró que la formulación de anticuerpos anti-HER2 de la presente invención cumplió con la mayoría de los parámetros de evaluación de estabilidad y, por lo tanto, se espera que sea estable durante la duración restante del estudio de estabilidad a largo plazo.

Tabla 20: Sumario de los parámetros de evaluación de la estabilidad para el producto farmacológico del anticuerpo anti-HER2 en los tiempos y temperaturas ensayados

Mes	0 líquido	0 después de liofilización	1			2			3			6			9			12		
			5	25	40	5	25	40	5	25	40	5	25	40	5	25	40	5	25	40
Temp (°C)																				
Parámetro																				
SEC - HPLC	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
CEX-HPLC	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SDS-PAGE	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
A280	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
ELISA de unión	x	✓	✓	✓	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
pH	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Apariencia	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Tiempo de Reconstitución	N/A	N/A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Partículas subvisibles	nd	✓	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Titulación de Karl Fisher	nd	✓	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
✓ : parámetro cumplido; x : parámetro no satisfecho; nd: no determinado; N/A: no aplicable																				

Listado de secuencias

<110> Glenmark Pharmaceuticals S.A.

<120> Formulaci3n de Antibiótico

<130> Solicitud PCT

<150> US 61/745,293

<151> 2012-12-21

<160> 11

<170> PatentIn versi3n 3.5

<210> 1

<211> 1255

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
1          5          10          15

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
          20          25          30

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
          35          40          45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
          50          55          60

Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
65          70          75          80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
          85          90          95

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
          100          105          110

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
          115          120          125

Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
          130          135          140

Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
145          150          155          160

Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn

```

ES 2 773 103 T3

165										170					175				
Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Asn	Arg	Ser	Arg	Ala	Cys				
			180					185					190						
His	Pro	Cys	Ser	Pro	Met	Cys	Lys	Gly	Ser	Arg	Cys	Trp	Gly	Glu	Ser				
		195					200					205							
Ser	Glu	Asp	Cys	Gln	Ser	Leu	Thr	Arg	Thr	Val	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys				
	210					215					220								
Ala	Arg	Cys	Lys	Gly	Pro	Leu	Pro	Thr	Asp	Cys	Cys	His	Glu	Gln	Cys				
225					230					235					240				
Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Lys	His	Ser	Asp	Cys	Leu	Ala	Cys	Leu				
				245					250					255					
His	Phe	Asn	His	Ser	Gly	Ile	Cys	Glu	Leu	His	Cys	Pro	Ala	Leu	Val				
			260					265					270						
Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser	Met	Pro	Asn	Pro	Glu	Gly	Arg				
		275					280					285							
Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ala	Cys	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Leu				
	290					295					300								
Ser	Thr	Asp	Val	Gly	Ser	Cys	Thr	Leu	Val	Cys	Pro	Leu	His	Asn	Gln				
305					310					315					320				
Glu	Val	Thr	Ala	Glu	Asp	Gly	Thr	Gln	Arg	Cys	Glu	Lys	Cys	Ser	Lys				
				325					330					335					
Pro	Cys	Ala	Arg	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu	Gly	Met	Glu	His	Leu	Arg	Glu				
			340					345					350						
Val	Arg	Ala	Val	Thr	Ser	Ala	Asn	Ile	Gln	Glu	Phe	Ala	Gly	Cys	Lys				
		355					360					365							
Lys	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Phe	Asp	Gly	Asp				
	370					375					380								
Pro	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Pro	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	Leu	Gln	Val	Phe				
385					390					395					400				
Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ala	Trp	Pro				
				405					410					415					

ES 2 773 103 T3

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

ES 2 773 103 T3

Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg
 675 680 685
 Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
 690 695 700
 Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu
 705 710 715 720
 Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
 725 730 735
 Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
 740 745 750
 Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
 755 760 765
 Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg
 770 775 780
 Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu
 785 790 795 800
 Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg
 805 810 815
 Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly
 820 825 830
 Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
 835 840 845
 Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe
 850 855 860
 Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp
 865 870 875 880
 Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg
 885 890 895
 Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
 900 905 910
 Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala
 915 920 925

ES 2 773 103 T3

Arg	Glu	Ile	Pro	Asp	Leu	Leu	Glu	Lys	Gly	Glu	Arg	Leu	Pro	Gln	Pro
930						935					940				
Pro	Ile	Cys	Thr	Ile	Asp	Val	Tyr	Met	Ile	Met	Val	Lys	Cys	Trp	Met
945					950					955					960
Ile	Asp	Ser	Glu	Cys	Arg	Pro	Arg	Phe	Arg	Glu	Leu	Val	Ser	Glu	Phe
				965					970					975	
Ser	Arg	Met	Ala	Arg	Asp	Pro	Gln	Arg	Phe	Val	Val	Ile	Gln	Asn	Glu
			980					985						990	
Asp	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Pro	Leu	Asp	Ser	Thr	Phe	Tyr	Arg	Ser	Leu
		995					1000					1005			
Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Met	Gly	Asp	Leu	Val	Asp	Ala	Glu	Glu	Tyr	
	1010					1015					1020				
Leu	Val	Pro	Gln	Gln	Gly	Phe	Phe	Cys	Pro	Asp	Pro	Ala	Pro	Gly	
	1025					1030					1035				
Ala	Gly	Gly	Met	Val	His	His	Arg	His	Arg	Ser	Ser	Ser	Thr	Arg	
	1040					1045					1050				
Ser	Gly	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr	Leu	Gly	Leu	Glu	Pro	Ser	Glu	Glu	
	1055					1060					1065				
Glu	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Glu	Gly	Ala	Gly	Ser	
	1070					1075					1080				
Asp	Val	Phe	Asp	Gly	Asp	Leu	Gly	Met	Gly	Ala	Ala	Lys	Gly	Leu	
	1085					1090					1095				
Gln	Ser	Leu	Pro	Thr	His	Asp	Pro	Ser	Pro	Leu	Gln	Arg	Tyr	Ser	
	1100					1105					1110				
Glu	Asp	Pro	Thr	Val	Pro	Leu	Pro	Ser	Glu	Thr	Asp	Gly	Tyr	Val	
	1115					1120					1125				
Ala	Pro	Leu	Thr	Cys	Ser	Pro	Gln	Pro	Glu	Tyr	Val	Asn	Gln	Pro	
	1130					1135					1140				
Asp	Val	Arg	Pro	Gln	Pro	Pro	Ser	Pro	Arg	Glu	Gly	Pro	Leu	Pro	
	1145					1150					1155				
Ala	Ala	Arg	Pro	Ala	Gly	Ala	Thr	Leu	Glu	Arg	Pro	Lys	Thr	Leu	

ES 2 773 103 T3

[illegible]

<223> LCDR1 de anticuerpo anti-HER2

<400> 5

		Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Asn	Thr	Ala	Val	Ala
5		1				5					10	
	<210> 6											
	<211> 7											
	<212> PRT											
	<213> Artificial											

<220>

<223> LCDR2 de anticuerpo anti-HER2

<400> 6

			Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser
15			1				5		
	<210> 7								
	<211> 9								
	<212> PRT								
20	<213> Artificial								

<220>

<223> LCDR3 de anticuerpo anti-HER2

<400> 7

		Gln	Gln	His	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro	Thr
		1				5				
	<210> 8									
	<211> 120									
30	<212> PRT									
	<213> Artificial									

<220>

<223> VH de anticuerpo anti-HER2

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

ES 2 773 103 T3

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											

<210> 9
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL de anticuerpo anti-HER2

<400> 9

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			
					100					105					

<210> 10
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

ES 2 773 103 T3

<223> Cadena pesada del anticuerpo anti-HER2

<400> 10

```

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

```

ES 2 773 103 T3

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 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 Lys
 450

5 <210> 11
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cadena ligera del anticuerpo anti-HER2

ES 2 773 103 T3

<400> 11

```

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

```

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo que reconoce y se une al HER2 humano y que tiene una cadena pesada de SEQ ID NO: 10 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 11; un tampón de acetato, en la que el tampón de acetato es un tampón de acetato de sodio presente dentro de la formulación farmacéutica en una cantidad de entre 1 y 10 mM; un tensioactivo, en el que el tensioactivo es Polisorbato 80, presente dentro de dicha formulación farmacéutica en una cantidad entre 0,001 % y 0,1 % (p/p); un lioprotector, en el que el lioprotector es sacarosa presente en la formulación farmacéutica en una cantidad entre 5 % y 15 % (p/p) o sacarosa y manitol presente en la formulación farmacéutica en una cantidad entre 5 % y 15 % (p/w) sacarosa y 0,5 % y 5 % (p/p) de manitol; y un agente de carga, en el que el agente de carga es glicina presente dentro de la formulación farmacéutica en una cantidad entre 0,5 % y 1,5 % (p/p) y en el que el pH de la formulación está entre 5,9 y 6,0
2. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la formulación farmacéutica es una formulación líquida, una formulación liofilizada o una formulación reconstituida.
3. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el anticuerpo anti-HER2 o fragmento del mismo que reconoce y se une al HER2 humano, está presente dentro de la formulación farmacéutica en una cantidad de entre 10 y 40 mg/ml.
4. Una formulación farmacéutica liofilizada de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende 30 mg/ml de un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo que reconoce y se une a HER2 humano, 12 % (p/p) de sacarosa, 1 % (p/p) de glicina y Polisorbato 80 al 0,014 % (p/p) y tampón de acetato de sodio 5,75 mM, en la que el pH de la formulación es $5,7 \pm 0,2$.
5. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la formulación comprende un diluyente y es una formulación reconstituida.
6. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende 21 mg/ml de un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento del mismo que reconoce y se une a HER2 humano, 8,4 % (p/p) de sacarosa, 0,7 % (p/p) de glicina, 0,01 % (p/p) de Polisorbato 80, WFI y acetato de sodio 4 mM, en la que el pH de la formulación es $5,7 \pm 0,2$.
7. La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con HER2 seleccionado de un cáncer HER2 positivo, tal como cáncer de mama metastásico, cáncer de mama temprano y cáncer gástrico metastásico.
8. Un artículo de manufactura que comprende:
 - (a) un contenedor que contiene una formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-7; e
 - (b) instrucciones para reconstituir la formulación liofilizada con un diluyente a una concentración de anticuerpo en la formulación reconstituida de aproximadamente 10 a 40 mg/ml.

Figura 1a

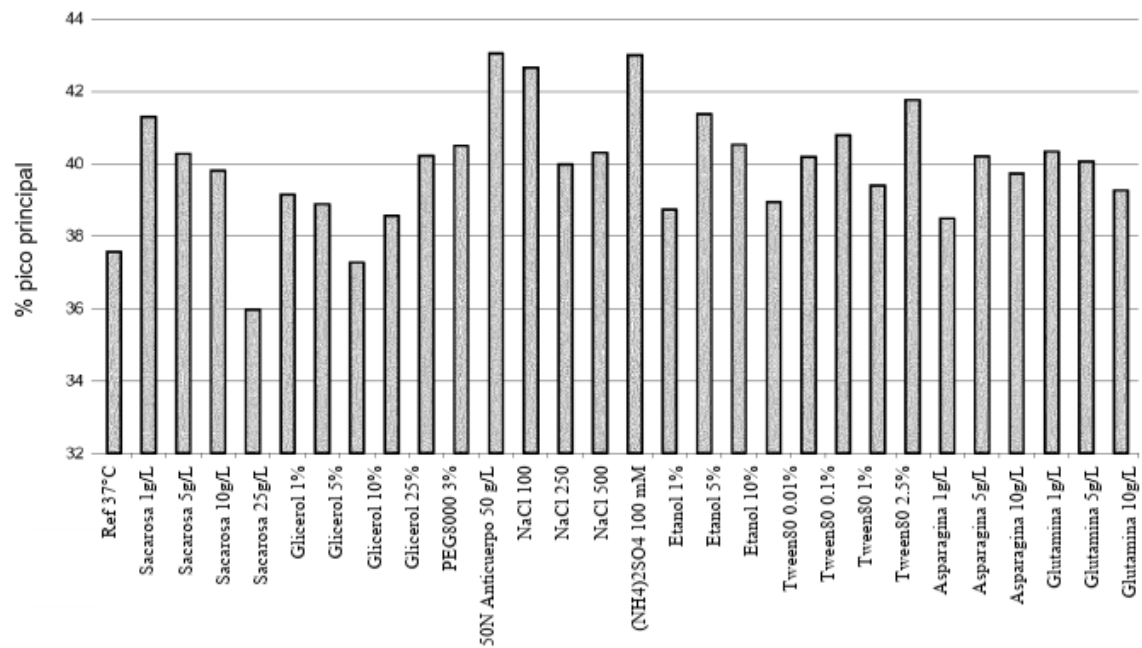


Figura 1b

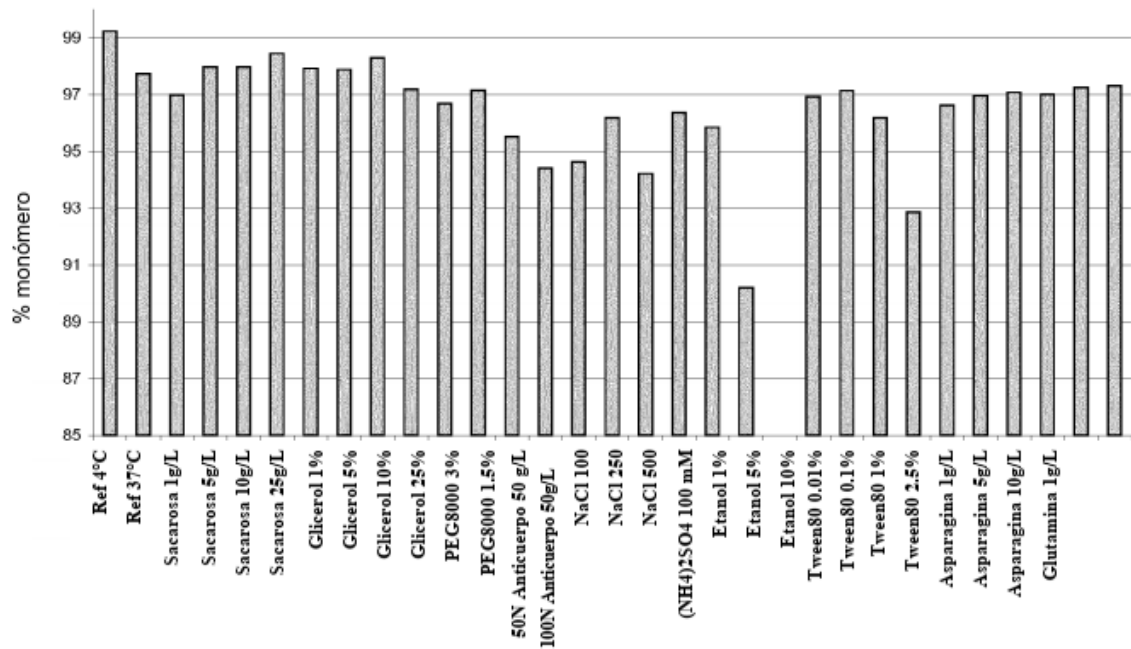


Figura 1c

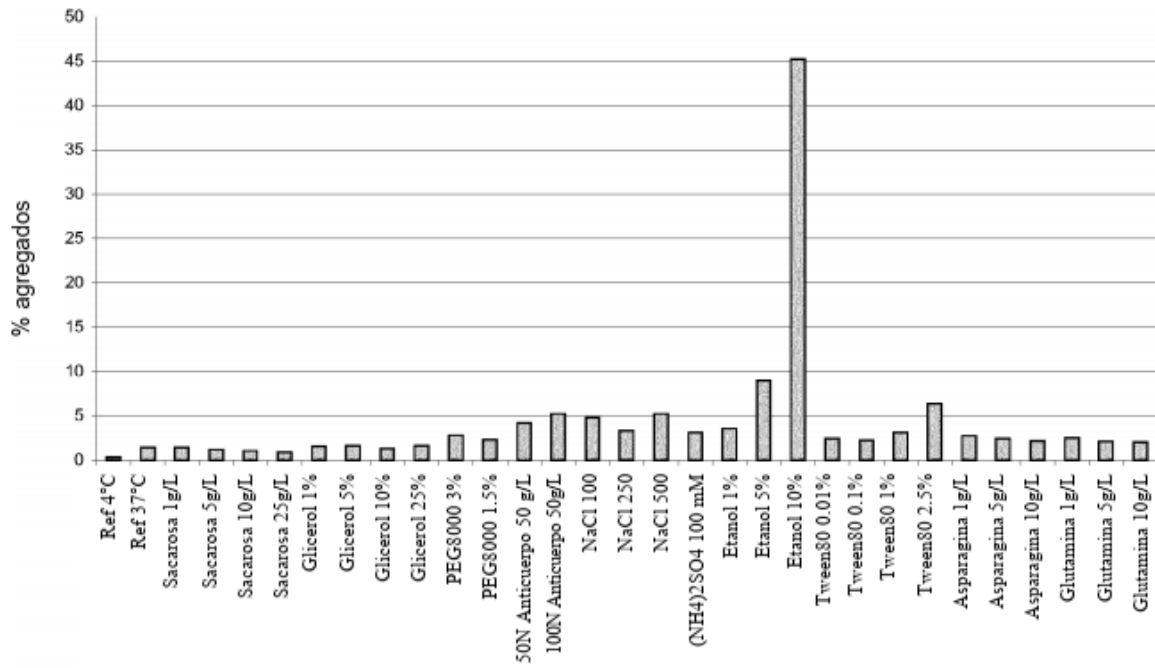


Figura 1d

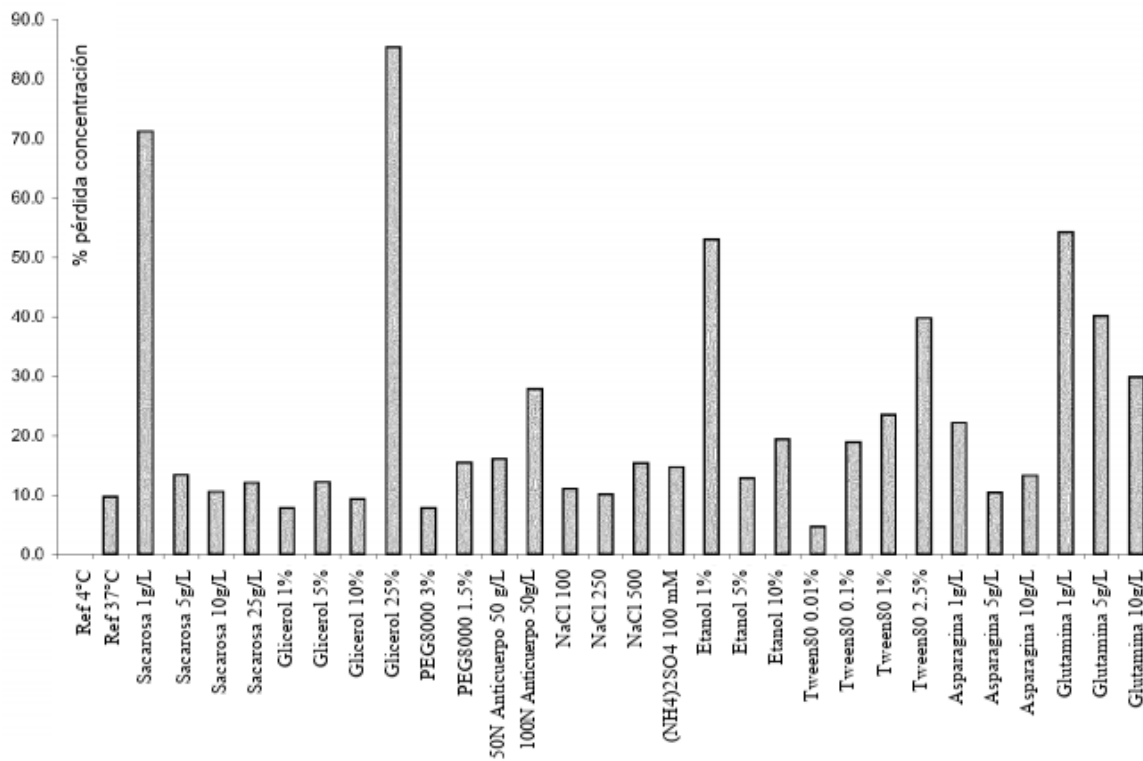


Figura 2a

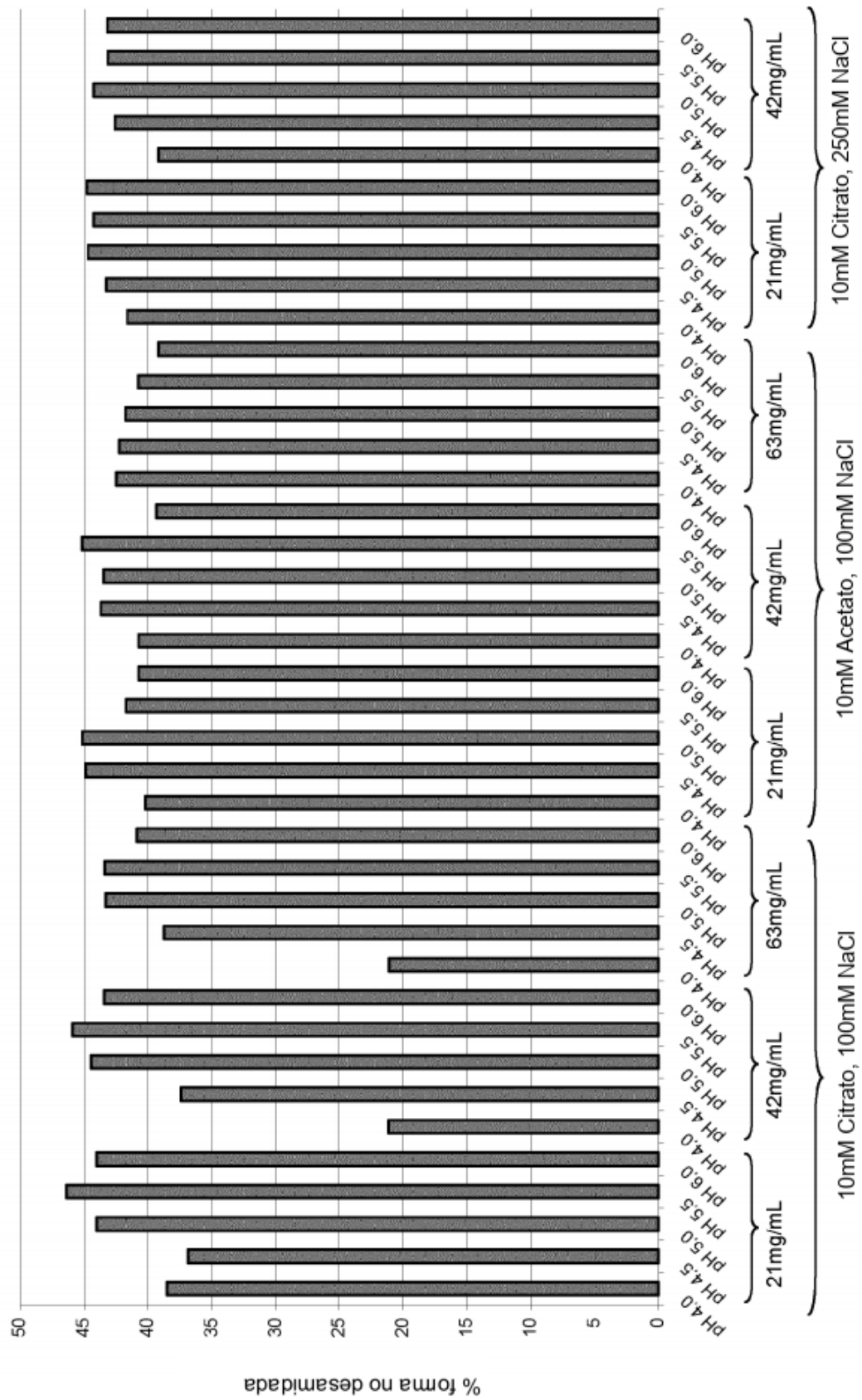


Figura 2b

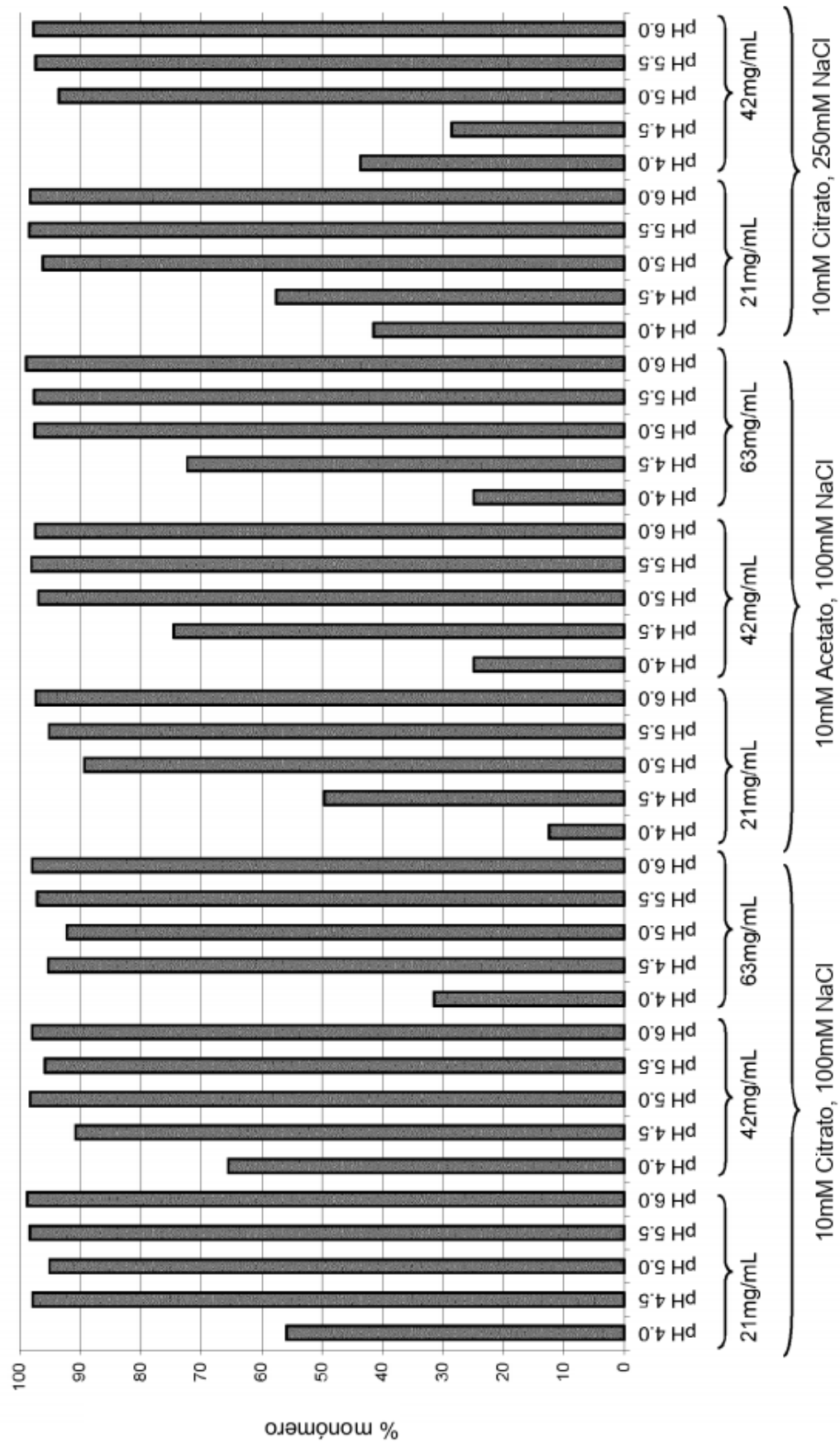


Figura 2c

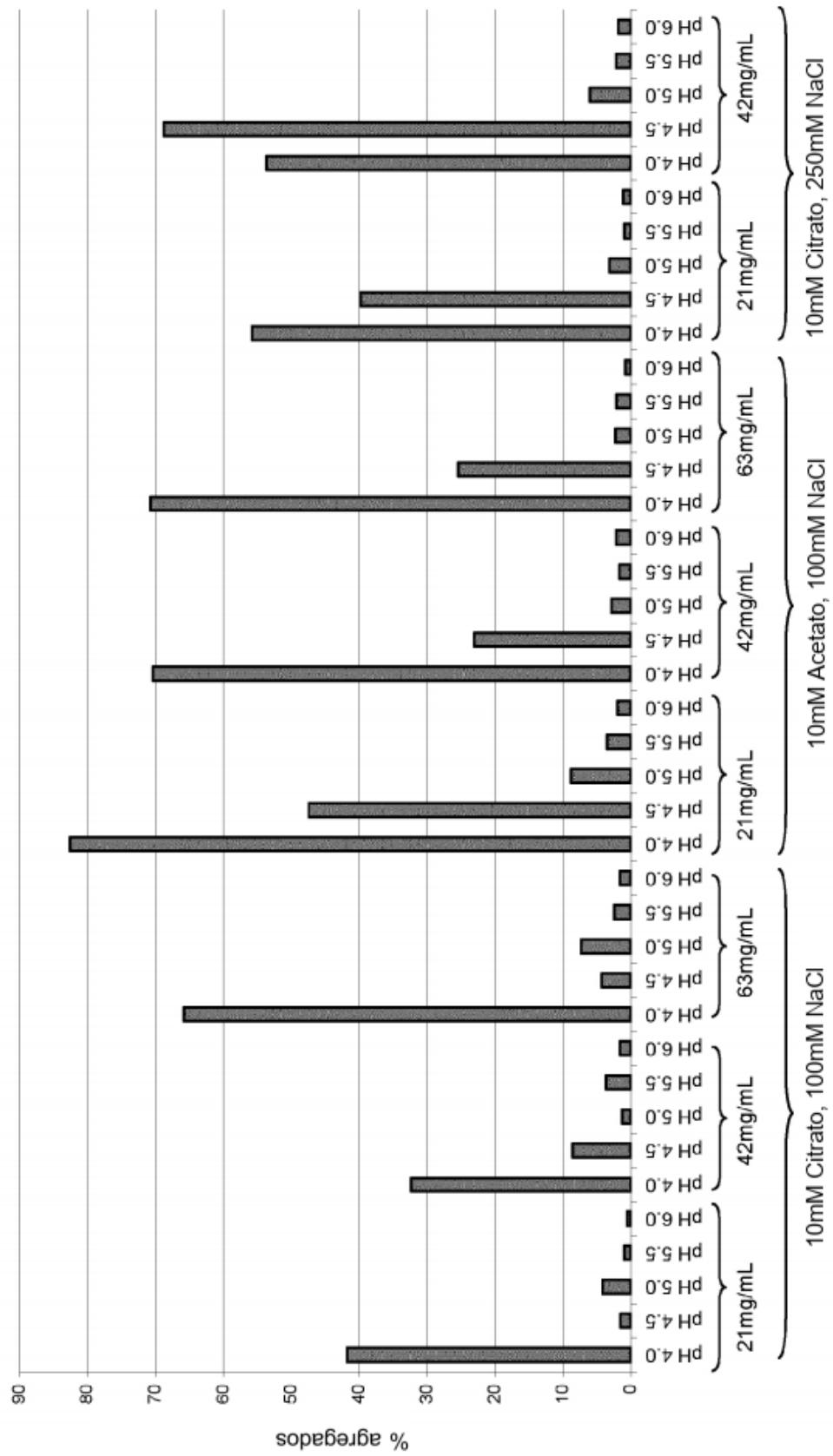


Figura 2e

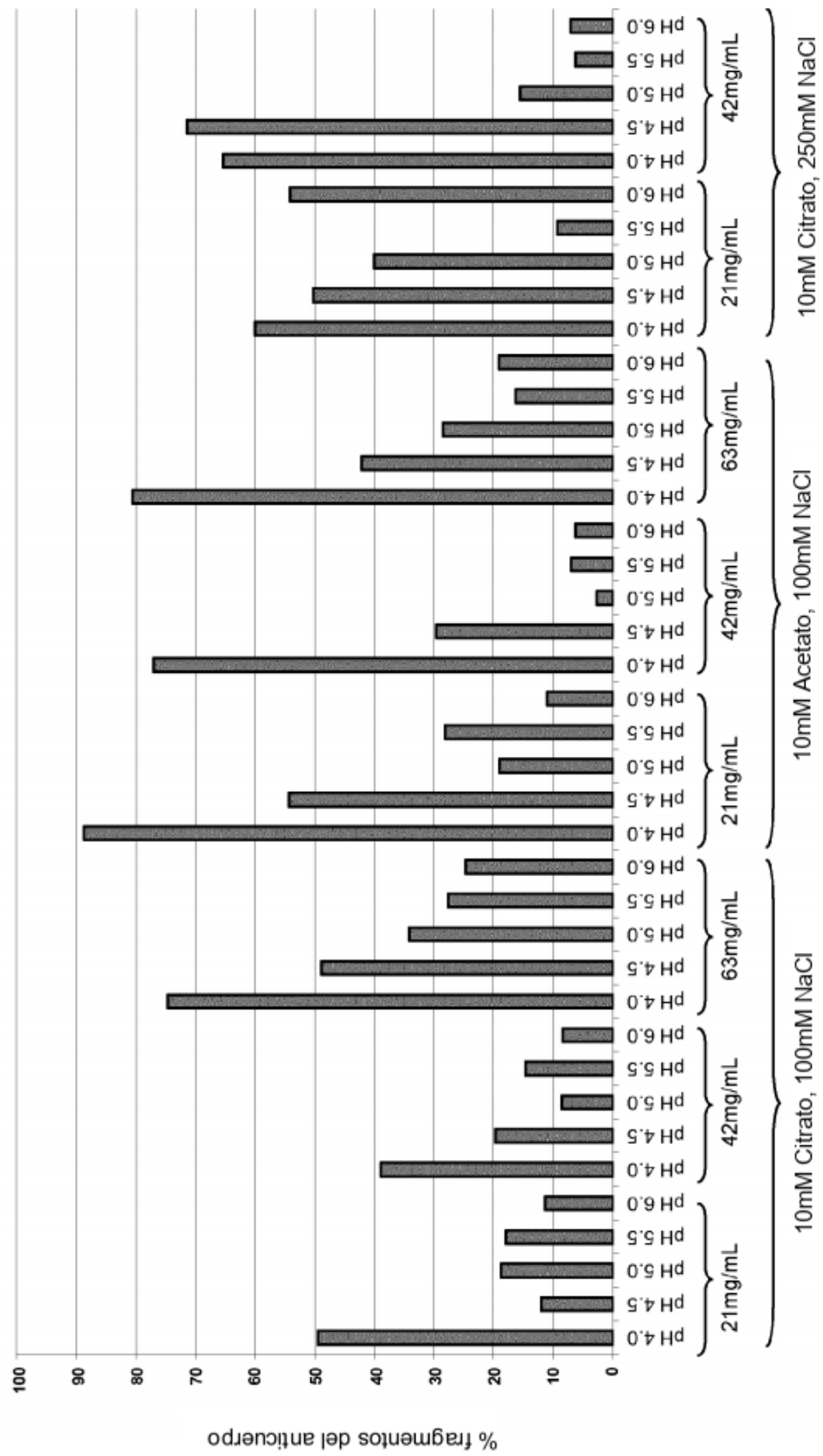


Figura 3a

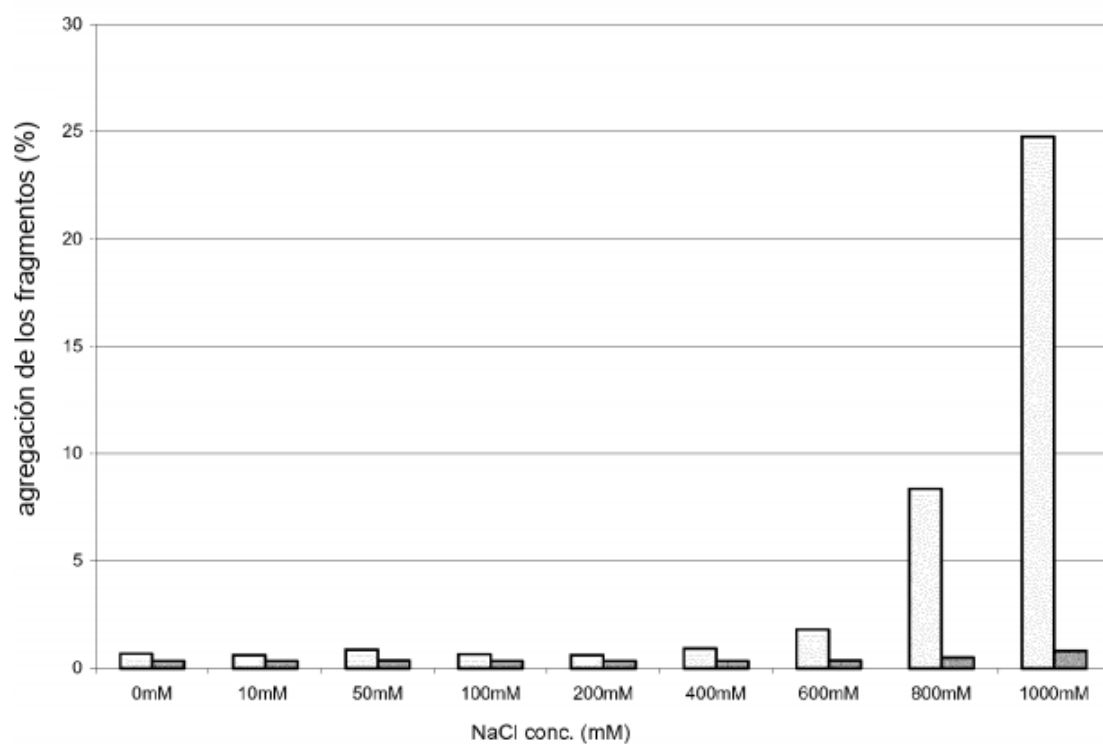


Figura 3b

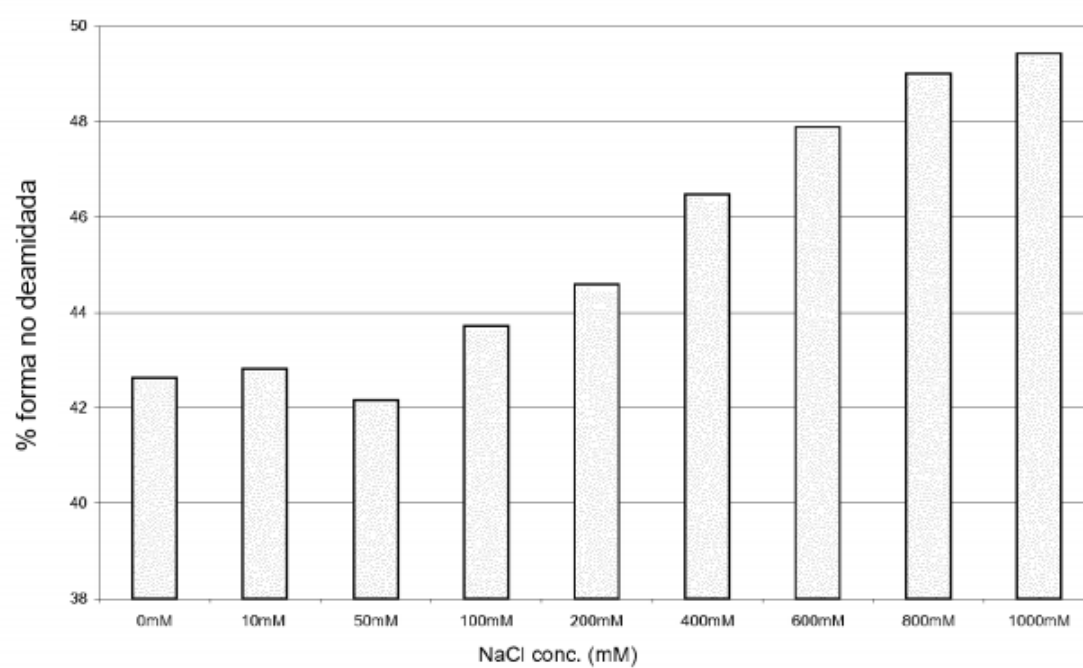


Figura 3c

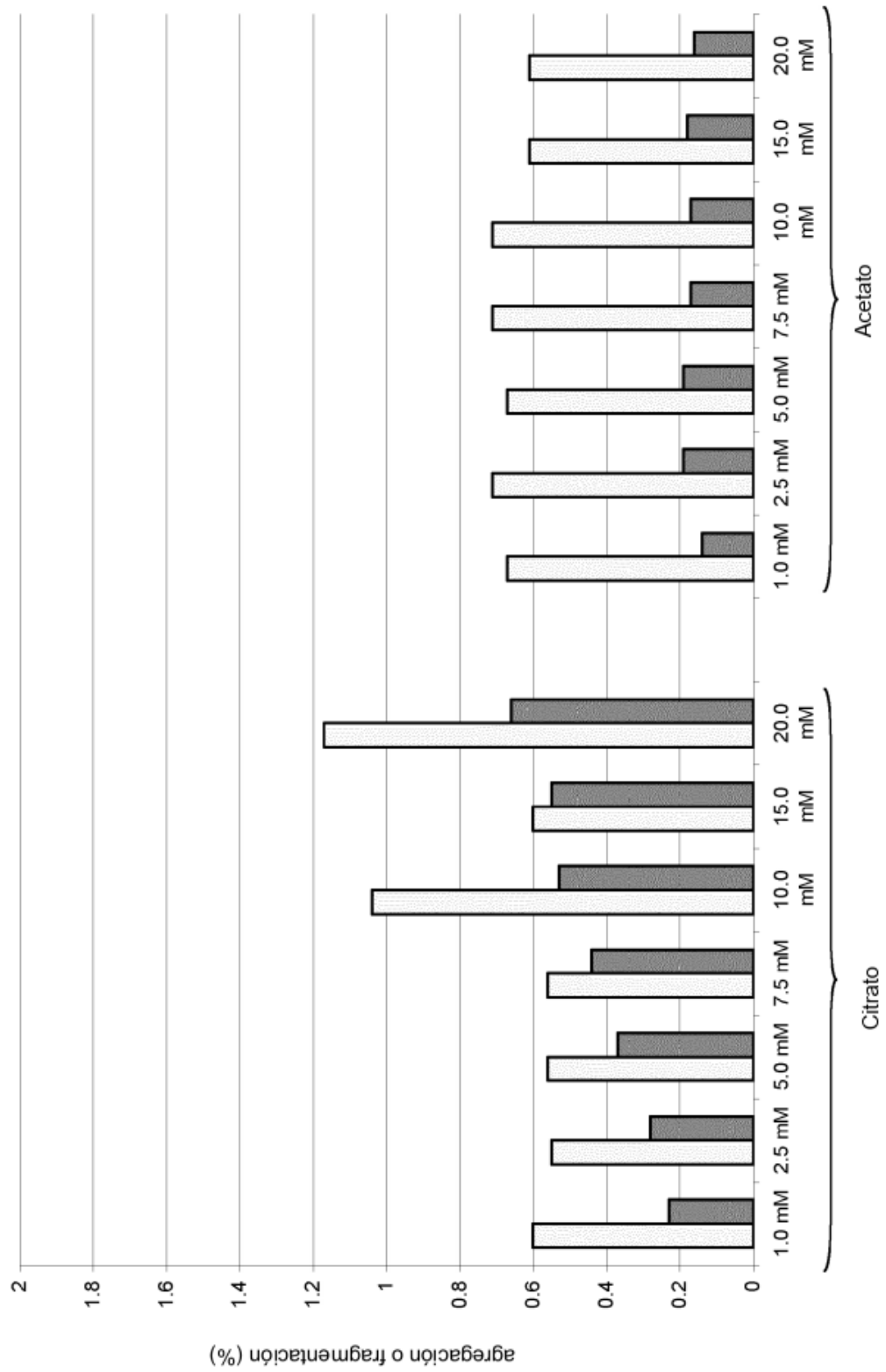


Figura 4

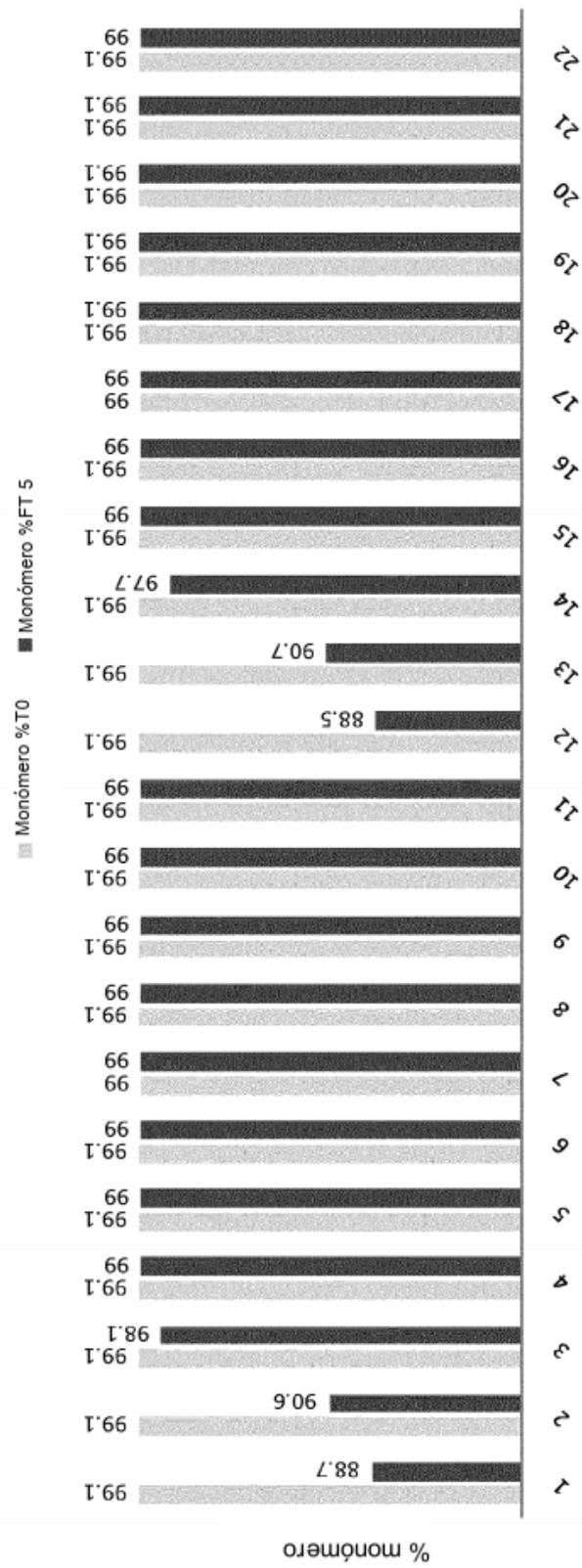


Figura 5

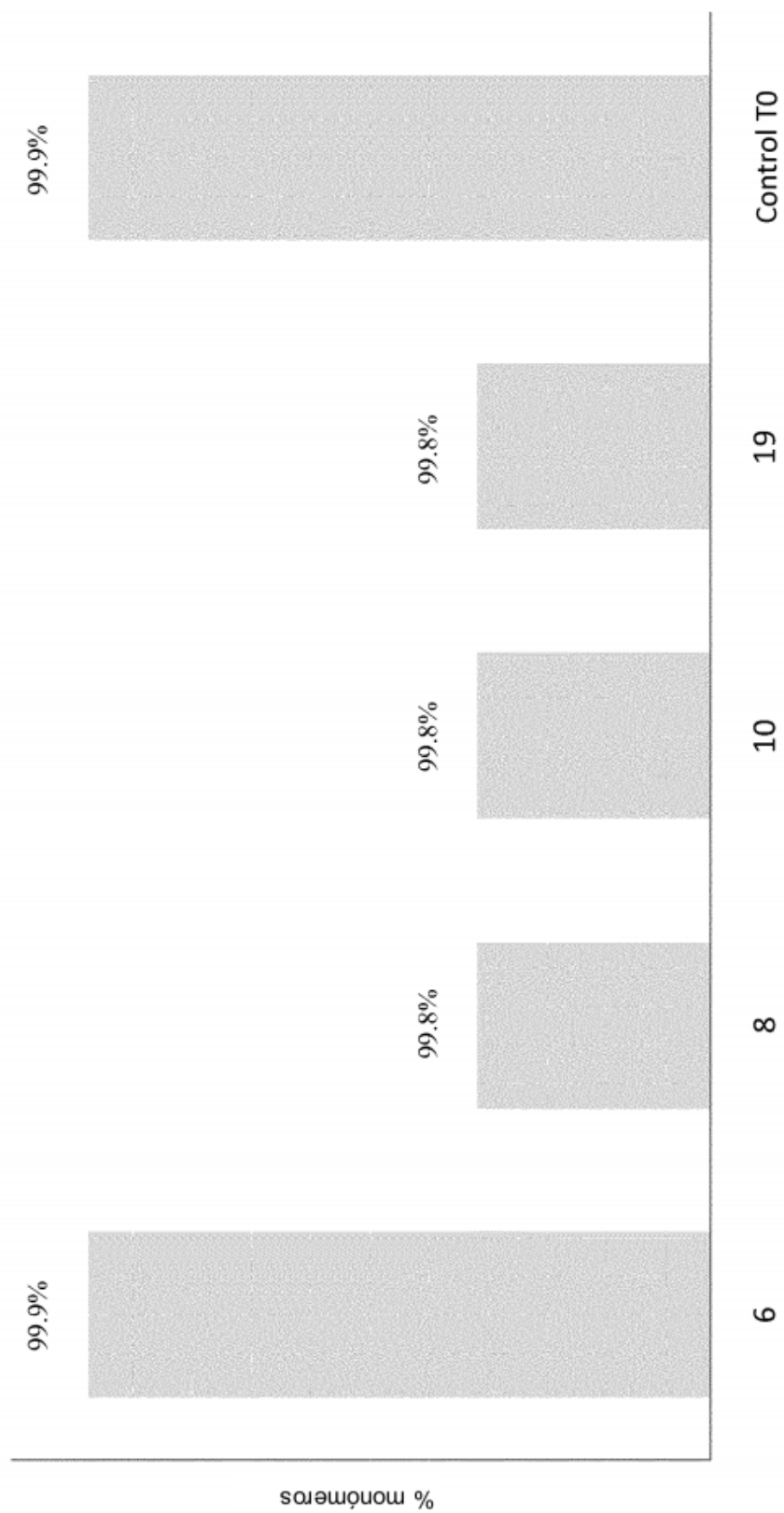


Figura 6

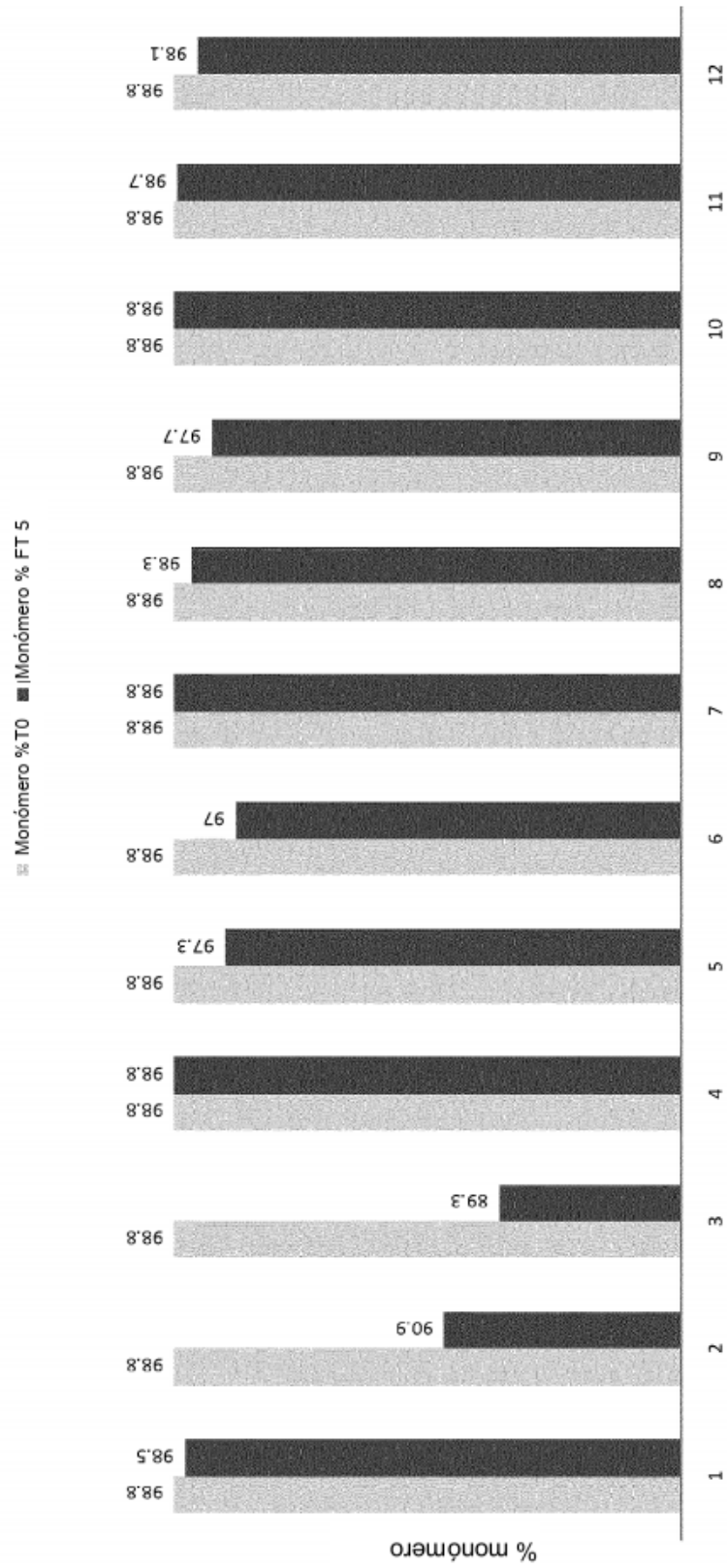


Figura 7

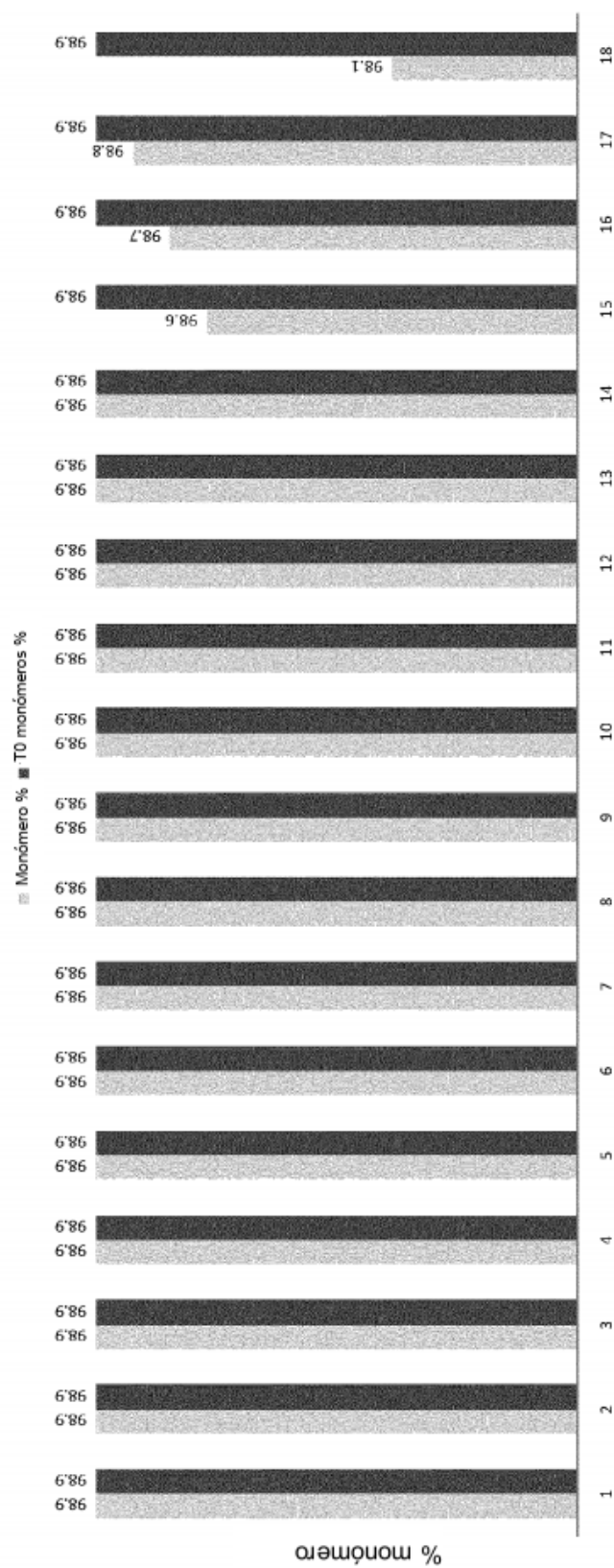


Figura 8a

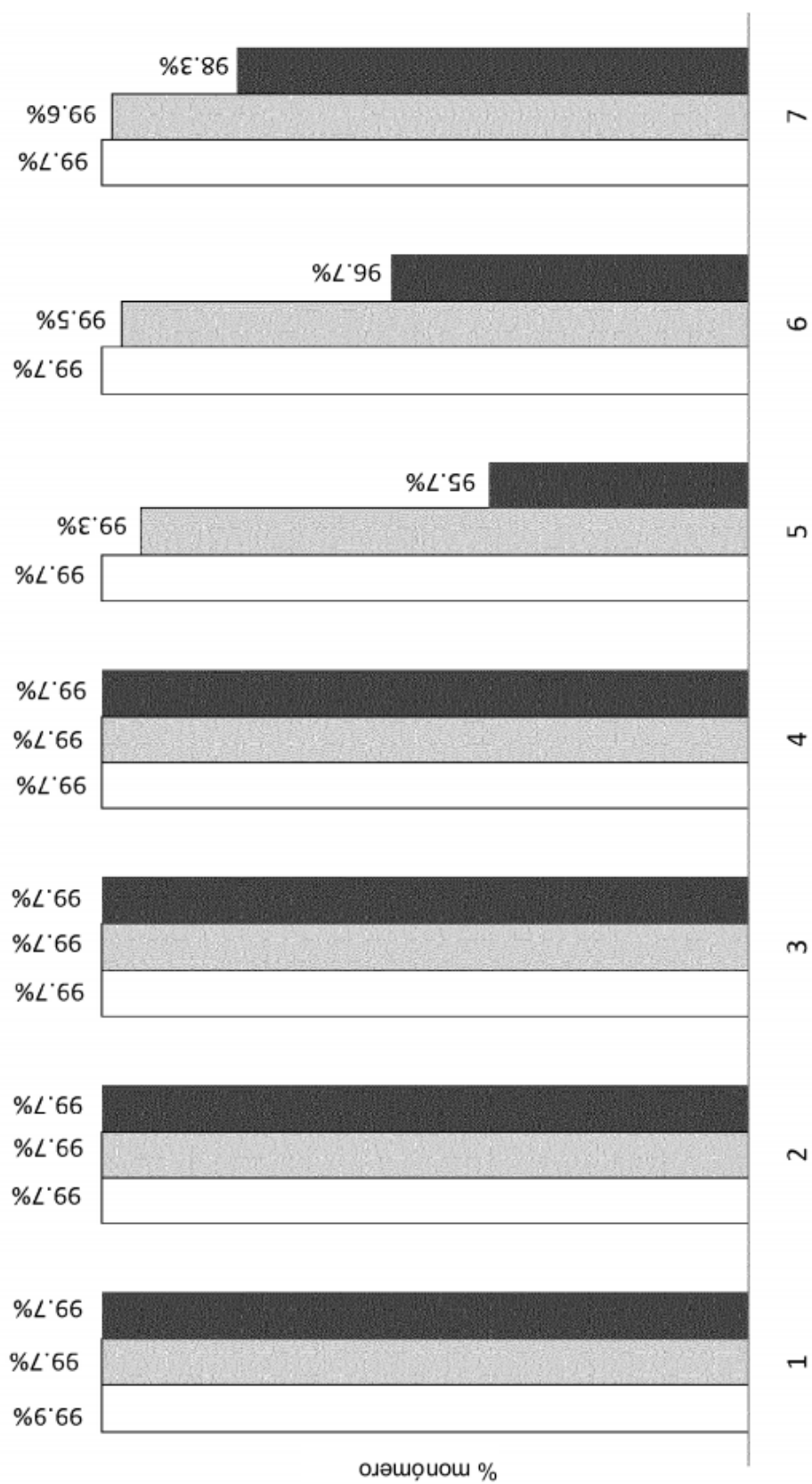


Figura 8b

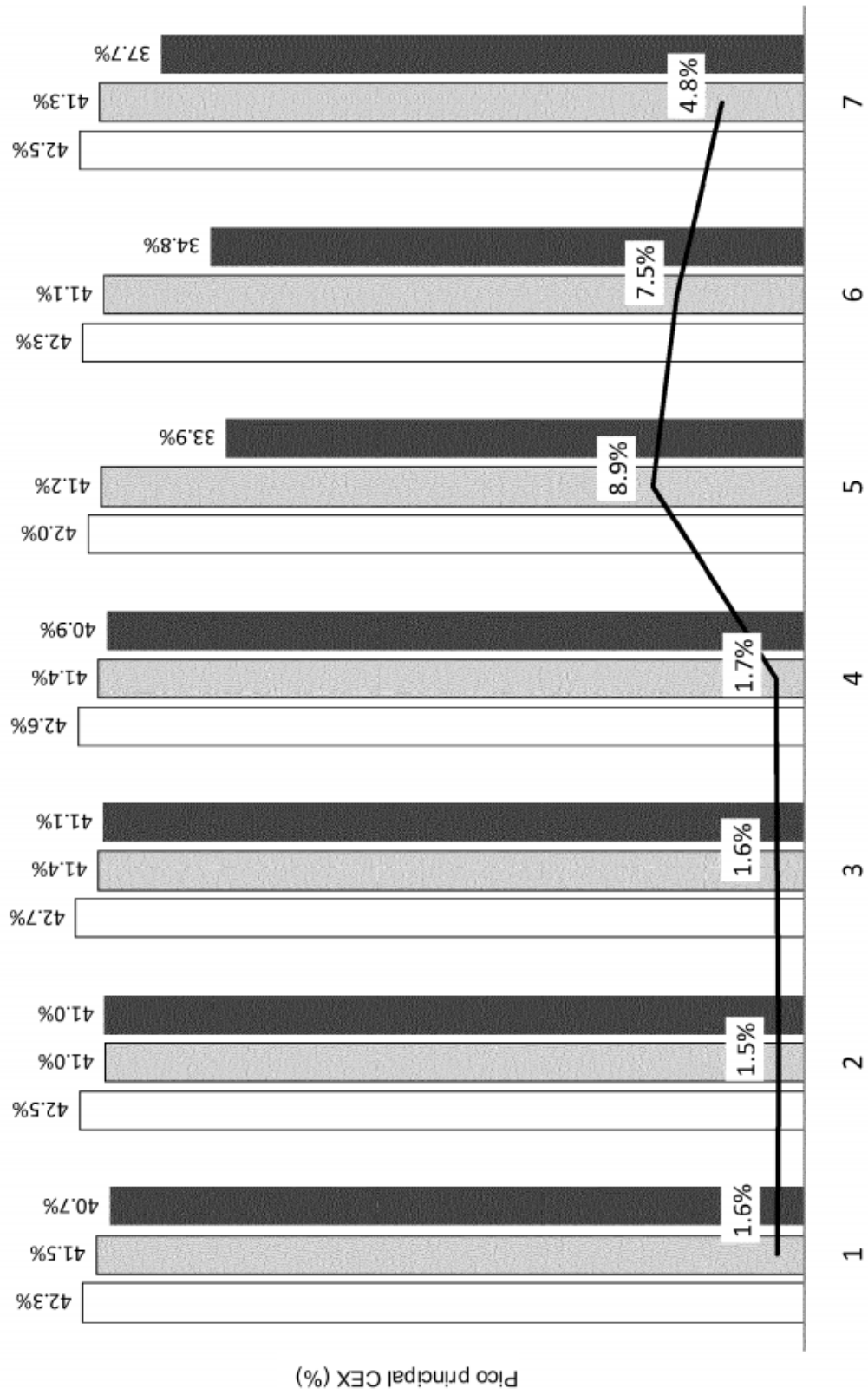


Figura 8c

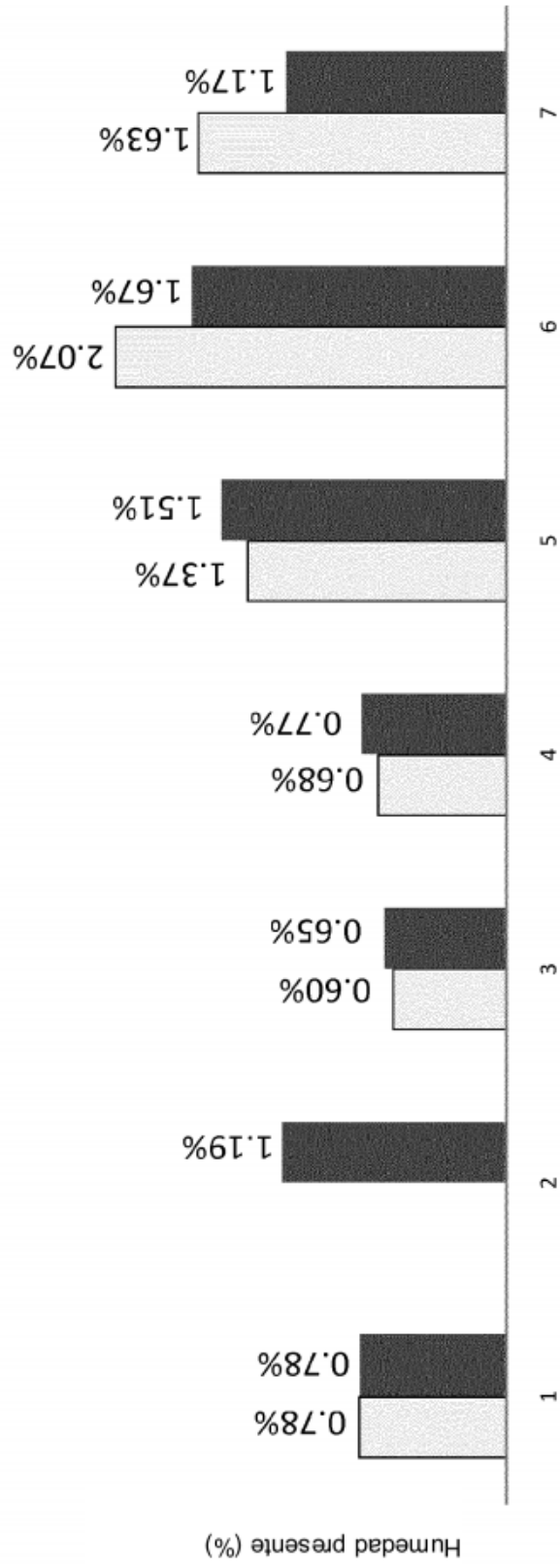


Figura 9a

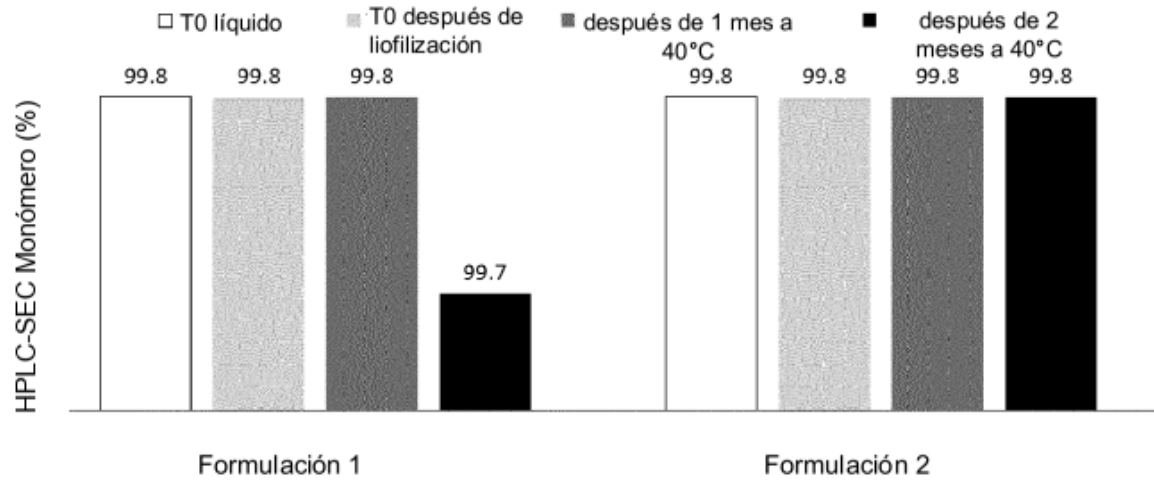


Figura 9b

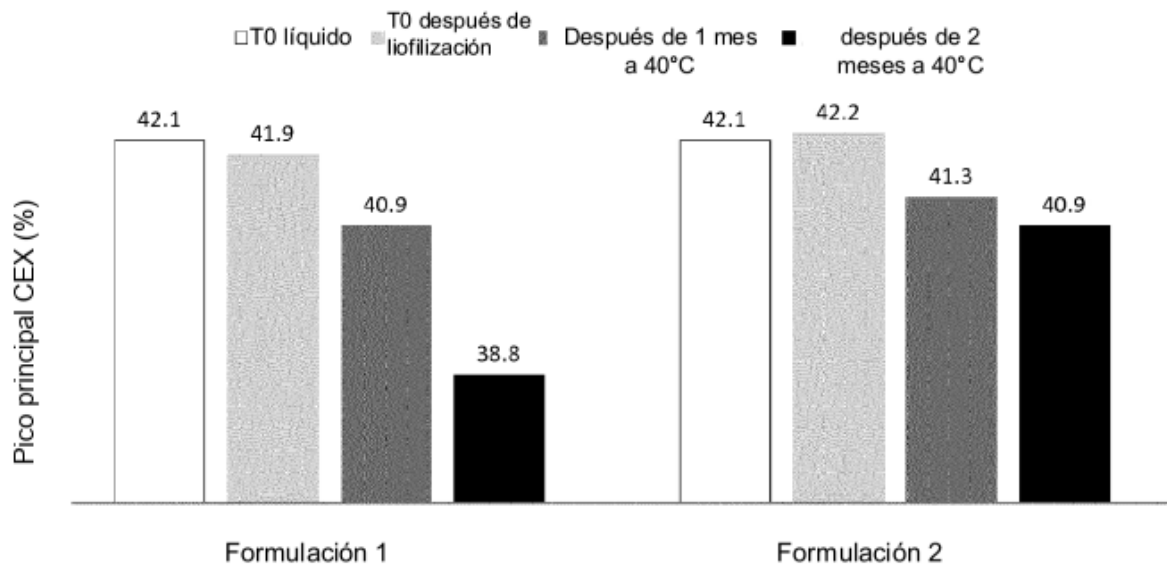


Figura 10a

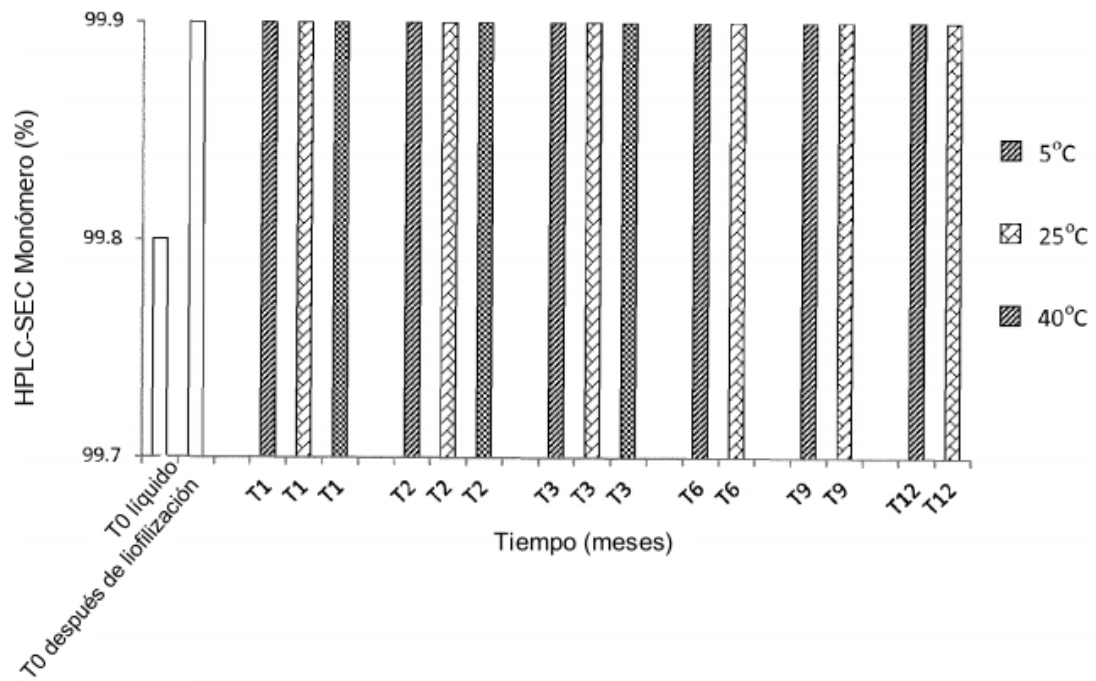


Figura 10b

