

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 823 279**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.12.2016 PCT/EP2016/002040**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.06.2017 WO17097407**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2016 E 16818985 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020 EP 3386541**

54 Título: **Formulación farmacéutica acuosa que comprende el anticuerpo anti-PD-1 Avelumab**

30 Prioridad:

07.12.2015 EP 15198233

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

06.05.2021

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (50.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE y
PFIZER INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RINALDI, GIANLUCA;
DEL RIO, ALESSANDRA;
FRATARCANGELI, SILVIA;
VOSS, SENTA y
WEIGANDT, MARKUS**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 823 279 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 farmacéutica acuosa que comprende el anticuerpo anti-PD-1 Avelumab

La presente invención se refiere a una formulación de anticuerpo anti-PD-L1 novedosa. En particular, la invención se refiere a una formulación farmacéutica acuosa del anticuerpo anti-PD-L1 Avelumab.

5 **Antecedentes de la Invención**

El receptor de muerte programada 1 (PD-1) y ligandos 1 y 2 de PD-1 (PD-L1, PD-L2) desempeñan papeles integrales en la regulación inmune. Expresado en células T activadas, PD-1 se activa por PD-L1 y PD-L2 expresados por células estromales, células tumorales, o ambas, iniciando la muerte y la supresión inmune localizada de células T (Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999;5:1365-69; Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000;192:1027-34; Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002; 8:793-800. [Erratum, *Nat Med* 2002;8:1039; Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 2012;24:207-12), proporcionando potencialmente un ambiente inmunotolerante para el desarrollo y crecimiento tumoral. A la inversa, la inhibición de esta interacción puede aumentar las respuestas de células T locales y puede mediar en la actividad antitumoral en modelos animales no clínicos (Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. *Nat Med* 2002; 8:793-800. [Erratum, *Nat Med* 2002;8:1039; Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, et al. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12293-97). En el ámbito clínico, se ha informado que el tratamiento con anticuerpos que bloquean la interacción PD-1 – PD-L1 produce tasas de respuestas objetivas del 7% al 38% en pacientes con tumores sólidos avanzados o metastásicos, con perfiles de seguridad tolerables (Hamid O, Robert C, Daud A, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (Anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 2013;369:134-44; Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012;366(26):2455-65; Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012;366(26):2443-54; Herbst RS, Soria J-C, Kowanzet M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014;515:563-67). Notablemente, las respuestas parecían ser prolongadas, con duraciones de 1 año o más para la mayoría de los pacientes.

30 Avelumab (también conocido como MSB0010718C) es un anticuerpo monoclonal completamente humano del isotipo G1 de inmunoglobulina (Ig). Avelumab se une selectivamente a PD-L1 y bloquea de manera competitiva su interacción con PD-1.

En comparación con los anticuerpos anti-PD-1 que se dirigen hacia las células T, Avelumab se dirige hacia las células tumorales, y por lo tanto se espera que tenga menor cantidad de efectos secundarios, incluyendo un riesgo más bajo de problemas de seguridad relacionados con el sistema autoinmune, ya que el bloqueo de PD-L1 deja a la ruta de PD-L2 – PD-1 intacta para promover la autotolerancia periférica (Lachman Y, Wood CR, Chernova T, et al. PD-L1 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001;2(3):261-68).

Avelumab está siendo sometido a pruebas en la actualidad en el ámbito clínico en una cantidad de tipos de cánceres incluyendo el cáncer pulmonar de células no pequeñas, carcinoma urotelial, mesotelioma, carcinoma de células de Merkel, cáncer gástrico o de la unión gastroesofágica, cáncer de ovario y cáncer de mama.

40 Las secuencias de aminoácidos de Avelumab y sus variantes de secuencias y fragmentos de unión al antígeno, se dan a conocer en el documento WO2013079174, donde el anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de Avelumab se denomina A09-246-2. También se dan a conocer métodos de fabricación y ciertos usos médicos.

Los usos médicos adicionales de Avelumab se describen en los documentos WO2016137985, PCT/IB2016/052748, PCT/US2016/037498, PCT/US2016/053939, solicitud de patente estadounidense N° de serie 62/341.921.

45 El documento WO2013079174 también describe en la sección 2.4 una formulación acuosa humana de un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de Avelumab. Esta formulación comprende el anticuerpo en una concentración de 10 mg/ml, metionina como un antioxidante y tiene un pH de 5,5.

Un estudio de formulación para un anticuerpo anti-PD-L1 aglicosilado del tipo IgG1 se describe en el documento WO2015048520, donde se seleccionó una formulación con un pH de 5.8 para estudios clínicos.

50 **Descripción de la Invención**

Como Avelumab generalmente se administra a un paciente por medio de infusión intravenosa, y por tanto se proporciona en una forma acuosa, la presente invención se refiere a formulaciones acuosas adicionales que son adecuadas para estabilizar Avelumab con sus modificaciones pos-traduccionales, y en concentraciones más altas tal como se da a conocer en el documento WO2013079174.

La Figura 1a (SEQ ID NO:1) muestra la secuencia de cadena pesada de longitud completa de Avelumab, como se expresa por las células CHO empleadas como el organismo huésped.

5 Sin embargo, se observa con frecuencia que en el transcurso de la producción de anticuerpos la lisina C-terminal (K) de la cadena pesada se escinde. Situada en la parte Fc, esta modificación no tiene influencia alguna sobre la unión del anticuerpo con el antígeno. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la lisina C-terminal (K) de la secuencia de cadena pesada de Avelumab está ausente. La secuencia de cadena pesada de Avelumab sin la lisina C-terminal se muestra en la Figura 1b (SEQ ID NO:2).

La Figura 2 (SEQ ID NO:3) muestra la secuencia de cadena ligera de longitud completa de Avelumab.

Una modificación postraduccional de suma relevancia es la glicosilación.

10 La mayoría de las proteínas solubles y de unión a la membrana que se forman en el retículo endoplasmático de las células eucarióticas experimentan glicosilación, donde enzimas denominadas glicosiltransferasas unen una o más unidades de azúcar a sitios específicos de glicosilación de las proteínas. Con mayor frecuencia, los puntos de unión son los grupos NH₂ u OH, lo que conduce a glicosilación unida a N o unida a O.

15 Esto también se aplica a las proteínas, tales como anticuerpos, que se producen recombinantemente en células huéspedes eucarióticas. Los anticuerpos de IgG recombinantes contienen un sitio de glicosilación unida a N conservado en un cierto residuo de asparagina de la región Fc en el dominio CH₂. Existen muchas funciones físicas conocidas de glicosilación N-ligada en un anticuerpo tales como las que afectan su solubilidad y su estabilidad, resistencia a las proteasas, unión a receptores Fc, transporte celular y vida media en la circulación *in vivo* (Hamm M. et al., *Pharmaceuticals* 2013, 6, 393-406). Las estructuras de N-glicano de anticuerpos de IgG son estructuras del tipo complejas predominantemente biantenarias, que comprenden unidades de b-D-N-acetilglucosamina (GlcNac), manosa (Man) y frecuentemente galactosa (Gal) y fucosa (Fuc).

20

En Avelumab el sitio único de glicosilación es Asn300, situado en el dominio CH₂ de ambas cadenas pesadas. Los detalles de la glicosilación se describen en el Ejemplo 1.

25 Puesto que la glicosilación afecta la solubilidad y la estabilidad de un anticuerpo, resulta prudente tener este parámetro en cuenta cuando se quiere desarrollar una formulación estable, farmacéuticamente adecuada del anticuerpo.

Sorprendentemente, los inventores de la presente solicitud de patente han descubierto que es posible estabilizar Avelumab, completamente caracterizado por su secuencia de aminoácidos y sus modificaciones postraduccionales, en una cantidad de formulaciones acuosas sin la presencia de un antioxidante, a valores de pH tan bajos como 5,2.

Figuras

- 30 Figura 1a: Secuencia de cadena pesada de Avelumab (SEQ ID NO:1)
- Figura 1b: Secuencia de cadena pesada de Avelumab, que carece de K C-terminal (SEQ ID NO:2)
- Figura 2: Secuencia de cadena ligera de Avelumab (SEQ ID NO:3)
- Figura 3: Estructura secundaria de Avelumab
- Figura 4: Cromatograma 2AB HILIC-UPLC de Glicanos de Avelumab
- 35 Figura 5: Numeración de los picos de la Figura 4
- Figura 6: Agregados totales por SE-HPLC de formulaciones de DoE2 (40°C)
- Figura 7: Agregados totales por SE-HPLC de formulaciones de DoE2 (25°C)
- Figura 8: Fragmentos por Bioanalizador de formulaciones de DoE2 (40°C)
- Figura 9: Fragmentos por Bioanalizador de formulaciones de DoE2 (25°C)
- 40 Figura 10: Agrupamiento ácido y abundancia de pico principal de DoE2 (25°C)
- Figura 11: LMW de estabilidad a Largo Plazo (%) a 2-8°C
- Figura 12: Partículas sub-visibles de estabilidad a largo plazo $\geq 10 \mu\text{m}$ a 2-8°C
- Figura 13: Partículas sub-visibles de estabilidad a largo plazo $\geq 25 \mu\text{m}$ a 2-8°C
- Figura 14: Agrupamiento ácido de estabilidad a largo plazo (%) a 2-8°C
- 45 Figura 15: Pico Principal de estabilidad a largo plazo (%) a 2-8°C

- Figura 16: Agrupamiento básico de estabilidad a largo plazo (%) a 2-8°C
- Figura 17: LMW de estabilidad a largo plazo (%) a 25°C
- Figura 18: Partículas subvisibles de estabilidad a largo plazo $\geq 10 \mu\text{m}$ a 25°C
- Figura 19: Partículas subvisibles de estabilidad a largo plazo $\geq 25 \mu\text{m}$ a 25 °C
- 5 Figura 20: Agrupamiento ácido de estabilidad a largo plazo (%) a 25°C
- Figura 21: Pico principal de estabilidad a largo plazo (%) a 25°C
- Figura 22: Agrupamiento básico de estabilidad a largo plazo (%) a 25°C
- Figura 23: LMW de estabilidad a largo plazo (%) a 40°C
- Figura 24: Partículas subvisibles de estabilidad a largo plazo $\geq 10 \mu\text{m}$ a 40°C
- 10 Figura 25: Partículas subvisibles de estabilidad a largo plazo $\geq 25 \mu\text{m}$ a 40°C
- Figura 26: Agrupamiento ácido de estabilidad a largo plazo (%) a 40°C
- Figura 27: Pico principal de estabilidad a largo plazo (%) a 40°C
- Figura 28: Agrupamiento básico de estabilidad a largo plazo (%) a 40°C

Definiciones

- 15 A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos usados en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones tienen los siguientes significados expuestos a continuación.

Las referencias en el presente documento a “Avelumab” incluyen el anticuerpo anti-PD-L1 del tipo IgG1 según lo definido en el documento WO2013079174 por su secuencia de aminoácidos, y según lo definido en la presente solicitud de patente por su secuencia de aminoácidos y por sus modificaciones postraduccionales. Las referencias en el presente documento a “Avelumab” pueden incluir biosimilares los cuales, por ejemplo, pueden compartir al menos el 75%, adecuadamente al menos el 80%, adecuadamente al menos el 85%, adecuadamente al menos el 90%, adecuadamente al menos el 95%, adecuadamente al menos el 96%, adecuadamente al menos el 97%, adecuadamente al menos el 98% o más adecuadamente al menos el 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos descritas en el documento WO2013079174. Alternativa o adicionalmente, las referencias en la presente a “Avelumab” pueden incluir biosimilares los cuales difieren en las modificaciones postraduccionales, especialmente en el patrón de glicosilación, dado a conocer en el presente documento.

El término “biosimilar” (también conocido como genéricos intercambiables (en inglés “follow-on biologics”) se conoce muy bien en la técnica, y el experto apreciará fácilmente cuando una sustancia farmacológica será considerada un biosimilar de Avelumab. El término “biosimilar” se usa generalmente para describir versiones subsiguientes (generalmente de una fuente diferente) de “productos biofarmacéuticos innovadores” (“productos biológicos” cuya sustancia farmacológica se prepara mediante un organismo vivo o se deriva de un organismo vivo o a través de ADN recombinante o metodologías de expresión genética controlada) a los que se les ha otorgado oficialmente con anterioridad autorización para la comercialización. Puesto que los productos biológicos tienen un alto grado de complejidad molecular, y son generalmente sensibles a los cambios en los procesos de fabricación (por ejemplo, si se usan líneas celulares diferentes en su producción), y puesto que los fabricantes subsiguientes de los genéricos intercambiables generalmente no tienen acceso al clon molecular, banco de células, know-how con respecto al proceso de fermentación y purificación, ni a la propia sustancia farmacológica activa del originador (solamente al producto farmacológico comercializado del innovador), cualquier “biosimilar” probablemente no sea exactamente igual que el producto farmacológico del innovador.

En el presente documento, el término “tampón” o “disolución tamponante” se refiere a una disolución generalmente acuosa que comprende una mezcla de un ácido (en general un ácido débil, por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, forma de imidazolio de histidina) y su base conjugada (por ejemplo, una sal acetato o citrato, por ejemplo, acetato de sodio, citrato de sodio, o histidina) o alternativamente una mezcla de una base (generalmente una base débil, por ejemplo, histidina) y su ácido conjugado (por ejemplo, sal de histidina protonada). El pH de una “disolución tamponante” cambiará solamente en forma muy leve luego de la adición de una pequeña cantidad de ácido o base fuerte debido al “efecto tamponante” impartido por el “agente tamponante”.

En el presente documento, un “sistema tamponante” comprende uno o más agente(s) tamponante(s) y/o un conjugado(s) de ácido/base del o de los mismos, y más adecuadamente comprende uno o más agente(s) de amortiguación y un conjugado(s) ácido/base del o de los mismos, y más adecuadamente comprende un agente tamponante solamente y un conjugado ácido /base del mismo. A menos que se indique lo contrario, cualquier concentración estipulada en la presente con relación a un “sistema tamponante” (es decir, una concentración tamponante) se refiere, adecuadamente, a la concentración combinada del o de los agentes tamponantes y/o a sus conjugado(s) ácido /base. El de otro modo, las

concentraciones estipuladas en la presente con relación a un “sistema tamponante” se refieren adecuadamente a la concentración combinada de todas las especies tamponantes relevantes (es decir, las especies en equilibrio dinámico entre sí, por ejemplo, citrato/ácido cítrico). Como tal, una concentración determinada de un sistema tamponante de histidina generalmente se refiere a la concentración combinada de histidina y la forma imidazolio de histidina. Sin embargo, en el caso de histidina, las concentraciones son generalmente fáciles de calcular mediante referencia a las cantidades de entrada de histidina o una sal de la misma. El pH general de la composición que comprende el sistema tamponante relevante es generalmente un reflejo de la concentración en equilibrio de cada una de las especies tamponantes relevantes (es decir, el resto de agente(s) tamponante(s) a conjugado(s) ácido/base del mismo o de los mismos).

En el presente documento, el término “agente tamponante” se refiere a un componente ácido o base (generalmente un ácido débil o base débil) de un tampón o disolución tamponante. Un agente tamponante ayuda a mantener el pH de una disolución determinada en o cerca de un valor predeterminado, y los agentes tamponantes se eligen generalmente para complementar el valor predeterminado. Un agente tamponante es adecuadamente un compuesto único el cual da origen a un efecto tamponante deseado, especialmente cuando el agente tamponante se mezcla con (y adecuadamente es capaz de intercambio protónico con) una cantidad apropiada (dependiendo del pH predeterminado deseado) de su correspondiente “conjugado ácido/base”, o si la cantidad requerida de su correspondiente “conjugado ácido/base” se forma *in situ* – esto puede lograrse agregando ácido o base fuerte hasta que se alcanza el pH requerido. Por ejemplo en el sistema tamponante de acetato sódico, es posible comenzar con una disolución de acetato sódico (básica) la cual luego se acidifica con, por ejemplo, ácido clorhídrico, o a una disolución de ácido acético (ácida), se le agrega hidróxido sódico o acetato sódico hasta que se alcanza el pH deseado.

En general, un “estabilizante” se refiere a un componente que facilita el mantenimiento de la integridad estructural del fármaco biofarmacéutico, particularmente durante el congelamiento y/o liofilización y/o almacenamiento (especialmente cuando está expuesto a estrés). Este efecto estabilizante puede surgir por diversos motivos, aunque en general los estabilizantes pueden actuar como osmolitos los cuales mitigan contra la desnaturalización proteica. En el presente contexto, los estabilizantes son aminoácidos (es decir, aminoácidos libres que no son parte de un péptido o proteína – por ejemplo, glicina, arginina, histidina, ácido aspártico, lisina) y estabilizantes de azúcar, tal como poliol de azúcar (por ejemplo, manitol, sorbitol), y/o un disacárido (por ejemplo, trehalosa, sacarosa, maltosa, lactosa).

Los agentes usados como agentes tamponantes, antioxidantes o tensioactivos según la invención, quedan excluidos del significado del término “estabilizantes” tal como se usa en el presente documento aún si los mismos pueden exhibir, entre otras cosas, actividad estabilizante.

En el presente documento, el término “tensioactivo” se refiere a un agente tensioactivo, preferentemente un tensioactivo no iónico. Los ejemplos de tensioactivos usados en la presente incluyen polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20 (monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán) también conocido bajo la denominación comercial Tween 20); poloxámero (por ejemplo poloxámero 188, un copolímero de tribloques no iónico compuesto por una cadena hidrófoba central de polioxipropileno (poli(óxido de propileno)) flanqueada por dos cadenas hidrófilas de polioxietileno (poli(óxido de etileno)), también conocido bajo la denominación comercial Lutrol F 68).

En el presente documento, el término “estable” en general se refiere a la estabilidad física y/o estabilidad química y/o estabilidad biológica de un componente, generalmente un activo o composición del mismo, durante, la conservación/almacenamiento.

Los agentes usados como agentes tamponantes, antioxidantes o estabilizantes según la invención, quedan excluidos del significado del término “tensioactivos” tal como se usa en el presente documento, aún si los mismos pueden exhibir, entre otras cosas, actividad tensioactiva.

En el presente documento, el término “antioxidante” se refiere a un agente capaz de prevenir o reducir la oxidación del fármaco biofarmacéutico a ser estabilizado en la formulación. Los antioxidantes incluyen depuradores de radicales (por ejemplo, ácido ascórbico, BHT, sulfito sódico, ácido p-amino benzoico, glutatión o galato de propilo), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA o ácido cítrico) o terminadores de cadena (por ejemplo, metionina o N-acetil cisteína).

Los agentes usados como agentes tamponantes, estabilizantes o tensioactivos según la invención, quedan excluidos del significado del término “antioxidantes” en el presente contexto, aún si los mismos pueden exhibir, entre otras cosas, actividad antioxidativa.

Un “diluyente” es un agente que constituye el resto de los ingredientes en cualquier composición farmacéutica líquida, por ejemplo, de tal modo que los porcentajes en peso totalicen el 100%. En la presente, la composición farmacéutica líquida es una composición farmacéutica acuosa, de tal modo que un “diluyente” en el presente contexto es agua, preferentemente agua para inyección (WFI).

En el presente documento, el término “tamaño de partícula” o “tamaño de poro” se refiere respectivamente a la longitud de la dimensión más larga de una partícula o poro determinado. Ambos tamaños se pueden medir usando un analizador de tamaño de partícula láser y/o microscopios electrónicos (por ejemplo, microscopio electrónico de efecto túnel, TEM (por sus siglas en inglés), o microscopio electrónico de barrido, SEM (por sus siglas en inglés)). Se puede obtener el conteo de partículas (para cualquier tamaño determinado) usando los protocolos y equipos mencionados en los Ejemplos, que se refiere al conteo de partículas de partículas subvisibles.

En la presente, el término "aproximadamente" se refiere al intervalo de error usual para el respectivo valor conocido fácilmente por el experto en la técnica en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en la presente incluye (y describe) realizaciones que están dirigidas a aquel valor o parámetro per se. En caso de duda, o en caso de que no exista ningún entendimiento común reconocido en la técnica con relación al intervalo de error para un cierto valor o parámetro, "aproximadamente" significa $\pm 5\%$ de este valor o parámetro.

En el presente documento, el término "porcentaje de parte" con relación a las especies de glicanos se refiere directamente a la cantidad de especies diferentes. Por ejemplo, el término "el FA2G1 tiene una parte del 25% - 41% de todas las especies de glicanos" significa que, en 50 moléculas de anticuerpos analizadas, que tienen 100 cadenas pesadas, 25-41 de las cadenas pesadas exhibirán el patrón de glicosilación FA2G1.

Debe apreciarse que las referencias a "tratar" o "tratamiento" incluyen la profilaxis así como también el alivio de los síntomas establecidos de un estado. "Tratar" o "tratamiento" de un estado, trastorno o estado por lo tanto incluye: (1) prevenir o retardar la aparición de los síntomas clínicos del estado, trastorno o estado que se está desarrollando en un ser humano que puede padecer o estar predispuesto a padecer al estado, trastorno o estado aunque todavía no experimenta ni muestra síntomas clínicos o subclínicos del estado, trastorno o estado, (2) inhibir el estado, trastorno o estado, es decir, detener, reducir o retardar el desarrollo de la enfermedad o una recaída de la misma (en caso de tratamiento de mantenimiento) o al menos uno de sus síntomas clínicos o subclínicos, o (3) aliviar o atenuar la enfermedad, es decir, causar la regresión del estado, trastorno o estado o al menos uno de sus síntomas clínicos o subclínicos.

Formulación de anticuerpo anti-PD-L1 acuosa

En un primer aspecto, la invención proporciona una formulación farmacéutica acuosa de anticuerpo novedosa, que comprende:

(i) Avelumab en una concentración de 1 mg/mL a 30 mg/mL como el anticuerpo;

(ii) acetato o histidina en una concentración de 5 mM a 15 mM como el agente tamponante;

(iii) D-manitol o trehalosa en una concentración de 240 mM a 320 mM, o una combinación de arginina HCl en una concentración de 50 a 150 mM y ácido glutámico en una concentración de 25 mM a 75 mM como un estabilizante;

(iv) poloxámero 188 o Polisorbato 20 en una concentración de 0,25 mg/mL a 0,75 mg/mL, como tensioactivo, o sin tensioactivo;

donde la formulación no comprende metionina, y

adicionalmente donde la formulación tiene un pH de 5.0 a 6.0, preferentemente, 5.0 a 5.6.

En una realización preferida la formulación no comprende ningún antioxidante.

En una realización la concentración de Avelumab en dicha formulación es de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 20 mg/mL.

En otra realización la concentración de acetato o histidina en dicha formulación es de aproximadamente 10 mM.

En aún otra realización la concentración de D-manitol o trehalosa en la formulación es de aproximadamente 280 mM, o para la combinación de arginina HCl y ácido glutámico, la concentración de arginina HCl es de aproximadamente 150 mM y la concentración de ácido glutámico es de aproximadamente 50 mM.

En aún otra realización la concentración de Poloxámero 188 o Polisorbato 20 en la formulación es de aproximadamente 0,5 mg/mL.

En aún otra realización, el pH de la formulación es 5,2 ($\pm 0,1$) a 5,5 ($\pm 0,1$). En una realización preferida, dicha formulación comprende acetato en una concentración de aproximadamente 10 mM, y no comprende ningún otro agente tamponante. En otra realización preferida dicha formulación comprende D-manitol o trehalosa en una concentración de aproximadamente 280 mM, y no comprende ningún otro estabilizante.

En aún otra realización preferida, dicha formulación comprende Polisorbato 20 o Poloxámero 188 en una concentración de aproximadamente 0,5 mg/mL, y no comprende ningún otro tensioactivo.

En una realización, dicha formulación comprende:

(i) Avelumab en una concentración de aproximadamente 10 mg/mL como el anticuerpo;

(ii) acetato en una concentración de aproximadamente 10 mM como el agente tamponante;

(iii) D-manitol o trehalosa en una concentración de aproximadamente 280 mM como un estabilizante;

(iv) Polisorbato 20 o Poloxámero 188 en una concentración de aproximadamente 0,5 mg/mL como tensioactivo;

y no comprende metionina, y tiene un pH de aproximadamente 5,5.

En una realización preferida, la formulación comprende:

(i) Avelumab en una concentración de 10 mg/mL;

(ii) acetato en una concentración de 10 mM;

5 (iii) D-manitol o trehalosa en una concentración de 280 mM;

(iv) Polisorbato 20 o Poloxámero 188 en una concentración de 0,5 mg/mL;

y tiene un pH de 5,5 ($\pm 0,1$).

En una realización preferida, la formulación consiste en:

(i) Avelumab en una concentración de 10 mg/mL;

10 (ii) acetato sódico trihidratado en una concentración de 10 mM;

(iii) D-manitol o trehalosa en una concentración de 280 mM;

(iv) Polisorbato 20 o Poloxámero 188 en una concentración de 0,5 mg/mL;

(v) HCl para ajustar el pH;

(vi) agua (para inyección) como el disolvente;

15 y tiene un pH de 5,5 ($\pm 0,1$).

En una realización preferida, la formulación consiste en:

(i) Avelumab en una concentración de 10 mg/mL;

(ii) acetato sódico trihidratado en una concentración de 10 mM;

(iii) trehalosa dihidratada en una concentración de 280 mM;

20 (iv) Polisorbato 20 en una concentración de 0,5 mg/mL;

(v) HCl para ajustar el pH;

(vi) agua (para inyección) como el diluyente;

y tiene un pH de 5,5 ($\pm 0,1$).

En una realización más preferida, la formulación consiste en:

25 (i) Avelumab en una concentración de 10 mg/mL;

(ii) acetato sódico trihidratado en una concentración de 10 mM;

(iii) D-manitol en una concentración de 280 mM;

(iv) Polisorbato 20 en una concentración de 0,5 mg/mL;

(v) HCl para ajustar el pH;

30 (vi) agua (para inyección) como el diluyente;

y tiene un pH de 5,5 ($\pm 0,1$).

En otra realización, dicha formulación comprende:

(i) Avelumab en una concentración de aproximadamente 20 mg/mL como el anticuerpo;

(ii) acetato en una concentración de aproximadamente 10 mM como el agente tamponante;

35 (iii) D-manitol o trehalosa en una concentración de aproximadamente 280 mM como un estabilizante;

(iv) Polisorbato 20 o Poloxámero 188 en una concentración de aproximadamente 0,5 mg/mL como tensioactivo;

y no comprende metionina, y tiene un pH de 5,2 ($\pm 0,1$).

En una realización preferida, dicha formulación comprende:

- (i) Avelumab en una concentración de 20 mg/mL;
 - (ii) acetato en una concentración de 10 mM;
 - (iii) D-manitol o trehalosa en una concentración de 280 mM;
 - 5 (iv) Polisorbato 20 o Poloxámero 188 en una concentración de 0,5 mg/mL;
- y tiene un pH de 5,5 ($\pm 0,1$).

En una realización preferida, dicha formulación comprende:

- (i) Avelumab en una concentración de 20 mg/mL;
 - (ii) ácido acético en una concentración de 10 mM;
 - 10 (iii) D-manitol o trehalosa dihidratada en una concentración de 280 mM;
 - (iv) Polisorbato 20 o Poloxámero 188 en una concentración de 0,5 mg/mL;
 - (v) acetato sódico para ajustar el pH;
 - (vi) agua (para inyección) como el diluyente;
- y tiene un pH de 5,2 ($\pm 0,1$).

15 En una realización más preferida, dicha formulación consiste en:

- (i) Avelumab en una concentración de 20 mg/mL;
 - (ii) ácido acético en una concentración de 10 mM;
 - (iii) D-manitol en una concentración de 280 mM;
 - (iv) Polisorbato 20 en una concentración de 0,5 mg/mL;
 - 20 (v) acetato sódico para ajustar el pH;
 - (vi) agua (para inyección) como el diluyente;
- y tiene un pH de 5,2 ($\pm 0,1$).

En una realización más preferida, dicha formulación consiste en:

- (i) Avelumab en una concentración de 20 mg/mL;
- 25 (ii) ácido acético en una concentración de 10 mM;
- (iii) trehalosa dihidratada en una concentración de 280 mM;
- (iv) Polisorbato 20 en una concentración de 0,5 mg/mL;
- (v) acetato sódico para ajustar el pH;
- (vi) agua (para inyección) como el diluyente;
- 30 y tiene un pH de 5,2 ($\pm 0,1$).

En una realización más preferida, dicha formulación consiste en:

- (i) Avelumab en una concentración de 20 mg/mL;
- (ii) ácido acético en una concentración de 10 mM;
- (iii) D-manitol en una concentración de 280 mM;
- 35 (iv) Poloxámero 188 en una concentración de 0,5 mg/mL;
- (v) acetato sódico para ajustar el pH;
- (vi) agua (para inyección) como el diluyente;

y tiene un pH de 5,2 (\pm 0,1).

En una realización más preferida, dicha formulación consiste en:

(i) Avelumab en una concentración de 20 mg/mL;

(ii) ácido acético en una concentración de 10 mM;

5 (iii) trehalosa dihidratada en una concentración de 280 mM;

(iv) Poloxámero 188 en una concentración de 0,5 mg/mL;

(v) acetato sódico para ajustar el pH;

(vi) agua (para inyección) como el diluyente;

y tiene un pH de 5,2 (\pm 0,1).

10 En una realización preferida, dicha formulación consiste en:

(i) Avelumab en una concentración de 20 mg/mL;

(ii) ácido acético en una concentración de 10 mM (0,6 mg/mL);

(iii) D-manitol en una concentración de 280 mM (51 mg/mL);

(iv) Polisorbato 20 en una concentración de 0,5 mg/mL;

15 (v) hidróxido sódico en una concentración de 7,5 mM (0,3 mg/mL);

(vi) agua (para inyección) como el diluyente;

y tiene un pH de 5,0 a 5,6, preferentemente 5,2 (\pm 0,1).

En una realización preferida, esta última formulación se prepara combinando:

(i) 20 mg/mL de Avelumab;

20 (ii) 0,6 mg/mL de ácido acético glacial;

(iii) 51 mg/mL de D-manitol;

(iv) 0,5 mg/mL de Polisorbato 20;

(v) 0,3 mg/mL de hidróxido sódico;

(vi) agua (para inyección) como el diluyente;

25 para obtener el volumen deseado de la formulación.

En una realización adicional, la invención se refiere a una formulación de anticuerpo farmacéutica acuosa, cuyo pH se ajusta con hidróxido sódico. Por consiguiente, la formulación consiste en Avelumab en una concentración de 20 mg/mL como el principio activo; y ácido acético glacial, D-manitol, Polisorbato 20, hidróxido sódico y agua para inyección como los excipientes; donde la formulación tiene un pH de 5,0 a 5,6, preferentemente 5,2 (\pm 0,1).

30 En una realización preferida, la formulación tiene una osmolalidad entre 270 y 330 mOsm/kg.

En una realización, dicho Avelumab en las formulaciones según tal como se describió anteriormente tiene la secuencia de cadena pesada de ya sea la Fig. 1a (SEQ ID NO:1) o de la Fig. 1b (SEQ ID NO:2), la secuencia de cadena ligera de Fig. 2 (SEQ ID NO:3), y porta una glicosilación en Asn300 que comprende FA2 y FA2G1 como las especies principales de glicanos, que tienen una parte conjunta de > 70% de todas las especies de glicanos.

35 En una realización preferida, en la glicosilación de Avelumab, el FA2 tiene una parte de 44% - 54% y el FA2G1 tiene una parte de 25% - 41% de todas las especies de glicanos.

En una realización preferida, en la glicosilación de Avelumab, el FA2 tiene una parte de 47% - 52% y el FA2G1 tiene una parte de 29% - 37% de todas las especies de glicanos.

40 En una realización preferida, en la glicosilación de Avelumab el FA2 tiene una parte de aproximadamente 49% y el FA2G1 tiene una parte de aproximadamente 30% - aproximadamente 35% de todas las especies de glicanos.

En una realización preferida la glicosilación de Avelumab comprende además como especie menor de glicano A2 con una parte de < 5%, A2G1 con una parte de < 5%, A2G2 con una parte de < 5% y FA2G2 con una parte de < 7% de todas las especies de glicanos.

5 En una realización preferida, en la glicosilación de Avelumab el A2 tiene una parte de 3%-5%, el A2G1 tiene una parte de < 4%, el A2G2 tiene una parte de < 3% y el FA2G2 tiene una parte de 5%-6% de todas las especies de glicanos.

En una realización preferida, en la glicosilación de Avelumab el A2 tiene una parte de aproximadamente 3,5% - aproximadamente 4,5%, el A2G1 tiene una parte de aproximadamente 0,5% - aproximadamente 3,5%, el A2G2 tiene una parte de < 2,5% y el FA2G2 tiene una parte de aproximadamente 5,5% de todas las especies de glicanos.

10 En una realización, el Avelumab en la formulación según lo descrito anteriormente tiene la secuencia de cadena pesada de Fig. 1b (SEQ ID NO:2).

En una realización, la formulación de Avelumab según lo descrito anteriormente es para administración intravenosa (IV).

Dispositivo para la administración del fármaco

15 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo para la administración del fármaco que comprende una composición farmacéutica líquida según lo definido en la presente invención. Adecuadamente, el dispositivo para la administración del fármaco comprende una cámara dentro de la cual se encuentra la composición farmacéutica. Adecuadamente, el dispositivo para la administración del fármaco es estéril.

El dispositivo de administración del fármaco puede ser un vial, ampolla, jeringa, pluma de inyección (por ejemplo, que incorpora esencialmente una jeringa), o bolsa i.v. (intravenosa).

20 Las formulaciones farmacéuticas acuosas se administran parenteralmente, preferentemente mediante inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección i.v. o infusión i.v. El modo de administración más preferido es la infusión i.v.

En una realización preferida, el dispositivo para la administración del fármaco es un vial que contiene la formulación según lo descrito anteriormente.

25 En una realización más preferida, el vial contiene 200 mg de Avelumab en 10 mL de disolución para una concentración de 20 mg/mL.

En una realización aún más preferida, el vial es un vial de vidrio.

Tratamiento Médico

En un tercer aspecto, la invención proporciona un método para tratar el cáncer que comprende administrar la formulación según lo descrito anteriormente a un paciente.

30 En una realización, el cáncer que será tratado se selecciona de cáncer pulmonar de células no pequeñas, carcinoma urotelial, cáncer de vejiga, mesotelioma, carcinoma de células de Merkel, cáncer gástrico o de la unión gastroesofágica, cáncer de ovario, cáncer de mama, timoma, adenocarcinoma del estómago, carcinoma adrenocortical, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma de células renales, melanoma, y/o linfoma de Hodgkin clásico.

Abreviaturas

35	ANOVA	Análisis de la varianza
	CD	Dicroísmo Circular
	CE	Electroforesis Capilar
	DoE	Diseño de Experimentos
	DP	Producto Farmacológico
40	DS	Sustancia Farmacológica
	DSF	Fluorimetría Diferencial de Barrido
	DTT	Ditiotreitol
	ESI	Ionización por Electropulverización
	HILIC	Cromatografía de Líquidos de Interacción Hidrófila
45	HMW	Pesos Moleculares Superiores

	HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alto Rendimiento
	iCE	Enfoque Isoeléctrico Capilar
	LC	Cromatografía de Líquidos
	LMW	Pesos Moleculares Más Bajos
5	MALDI	Láser de Desorción/Ionización asistida por Matriz
	MS	Espectrometría de masas
	NTU	Unidades Nefelométricas de Turbidez
	OD	Densidad óptica
	PBS	Solución Salina Tamponada con Fosfato
10	PES	Polietersulfona
	PVDF	Fluoruro de Polivinilideno
	SDS – PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato Sódico
	SE	Exclusión por Tamaño
	TOF	Tiempo de Vuelo
15	UPLC	Cromatografía de Líquidos de Ultra Rendimiento
	RH	Humedad Residual
	UV	Ultravioleta

Ejemplos

Métodos usados para determinar la Estabilidad

- 20 A fin de evaluar la estabilidad de las formulaciones de anticuerpo ensayadas, y seleccionar a los mejores candidatos, se determinaron el estrés térmico, el estrés mecánico, la exposición a la luz, la osmolalidad, la turbidez, el contenido proteico, agregados totales, fragmentación, pH, isoformas, dicroísmo circular, partículas subvisibles y actividad biológica como los parámetros de estabilidad según los siguientes protocolos:

Estrés térmico:

- 25 A 40°C: se incubaron las muestras en el envase del vial original en un gabinete termostático a una temperatura de 40°C ± 2°C (RH 75% ± 5%) y se extrajeron en puntos predeterminados en el tiempo.

A 25°C: se incubaron las muestras en el envase del vial original en un gabinete termostático a una temperatura de 25°C ± 2°C (RH 60% ± 5%) y se extrajeron en puntos predeterminados en el tiempo.

Estrés mecánico:

- 30 Se colocaron las muestras en el envase del vial original en un agitador orbital mantenido a 300 rpm durante hasta 24 horas (temperatura ambiente).

Exposición a la luz:

Las muestras en el envase del vial original fueron expuestas a una fuente de luz durante 7 horas ajustando el nivel de irradiancia en la máquina Suntest a 765 W/m² (longitud de onda de radiación entre 320 nm y 800 nm).

- 35 *Osmolalidad:*

El plasma humano normal tiene una osmolalidad de aproximadamente 280 mOsm/kg (Medical Physiology - Principles for Clinical Medicine. Editado por Rodney A. Rhoades PhD, David R. Bell PhD). En general, se debe apuntar a soluciones con una osmolalidad cercana a 300 mOsm/kg cuando se desarrollan formulaciones parenterales. Los intervalos aceptables (según las especificaciones del producto) son 250 – 400 mOsm/kg.

- 40 Aquí, se determinó la osmolalidad mediante un método crioscópico que determina la disminución del punto de congelación de soluciones acuosas después de la adición de solutos. La cantidad de solutos, y por tanto, el valor observado de osmolalidad es proporcional a la disminución observada del punto de congelación de la disolución compuesta.

Turbidez:

Se determinó la turbidez de las disoluciones con un nefelómetro con una capacidad de medir luz dispersa o atenuada (Hach Lange Modelo 2100AN). Se iluminaron aproximadamente 3 mL de disolución en cubetas de volumen reducido mediante un conjunto de diodos emisores de luz (LED, por sus siglas en inglés) de 870 ± 30 nm. Un detector monitorea la luz dispersa y proporcionó la turbidez (NTU, por sus siglas en inglés) de la disolución mediante comparación con una serie de estándares de turbidez conocida.

Contenido proteico:

Se determinó el contenido proteico mediante la densidad óptica de soluciones (diluidas hasta $\sim 0,5$ mg/mL de concentración proteica con tampón relevante) a 280 nm y 320 nm en cubetas de cuarzo de longitud de trayectoria de 1 cm. Suponiendo un coeficiente de extinción molar de $1,46 \text{ cm}^2/\text{mg}$, se obtuvo la concentración proteica aplicando la fórmula: $(A_{280} - A_{320}) / (1,46 \text{ cm}^2/\text{mg} \times 1 \text{ cm})$.

Agregados totales:

Se determinó la cantidad de agregados mediante el método de SE-HPLC. Se inyectó un volumen de muestra de 20 μL (muestra diluida hasta aproximadamente 0,5 mL con PBS) en un TSK gel Super SW3000 4,6 mm x 30 cm (cod. 18675) que se mantiene a una temperatura de $22 \pm 5^\circ\text{C}$ a un índice de flujo de 0,35 mL/min (la fase móvil era fosfato sódico 50 mM + perclorato sódico 0.4 a pH $6,3 \pm 0,1$). Detección de UV a 214 nm.

Fragmentación:

Se determinaron las especies de bajo peso molecular (o fragmentos) mediante Bioanalyzer (Bioanalizador). Se analizaron las muestras a una concentración que oscila entre $1,25 - 3,75$ mg/mL (diluciones preparadas con agua purificada). Se fusionaron 3 μL de cada muestra diluida con 2 μL del tampón de muestra correspondiente (con la adición de DTT cuando los ensayos se llevaron a cabo en condiciones reductoras) y 1 μL de una disolución de maleimida 60 mM. Las muestras se calentaron durante 5 minutos a 70°C , luego se agregaron 84 μL de agua purificada y las soluciones se sometieron a vórtice y se centrifugaron. Se cargaron 6 μL en el chip ($0,25 - 0,75$ μg de proteína). Se colocó el chip en el Bioanalizador de Agilent 2100 Bioanalyzer y el análisis comenzó dentro de los siguientes cinco minutos.

Isoformas:

Se determinó la distribución de las isoformas mediante iCE. Se usó un cartucho capilar recubierto con Fc (diámetro interno de 100 μm y longitud de 50 mm). La separación se llevó a cabo usando una disolución de NaOH de 100 mM en metilcelulosa al 0,1% como una disolución catódica y un ácido o-fosfórico 80 mM en metilcelulosa al 0,1% como una disolución anódica. Las muestras se prepararon comenzando a partir de 80 μL de disolución de mezcla maestra (obtenida mezclando 700 μL de metilcelulosa al 0,1%, 10 μL de Pharmalyte 5-8, 70 μL de Pharmalyte 8-10,5, 10 μL de un marcador 7.65 pl y 10 μL de un marcador 9.77 pl), a la cual se le agregó el volumen adecuado de muestra de Avelumab lavada (correspondiente a 200 μg de proteína después del lavado para eliminar los componentes de la formulación). Se agrega una cantidad de agua purificada correspondiente a (120 μL - volumen de muestra de Avelumab lavada agregada en la etapa previa). La separación se realiza a una longitud de onda de detección de 280 nm estableciendo tiempos de pre-enfoque y de enfoque de 1 y 15 minutos respectivamente y voltajes de pre-enfoque y enfoque de 1500 V y 3000 V respectivamente. Se inyectaron las muestras a una presión de 100 kPa (1000 mBar).

pH: se determinó mediante potenciometría convencional.

Dicroísmo Circular (CD):

Las investigaciones sobre la estructura terciaria de Avelumab se llevaron a cabo usando un espectropolarímetro de Dicroísmo Circular de Jasco (mod. J810) en el intervalo de UV cercanos (320 - 250 nm). Se diluyeron las muestras hasta una concentración proteica de 1,5 mg/mL con agua purificada y, una vez cargadas en cubetas de cuarzo de longitud de trayectoria de 1 cm, se analizaron a temperatura ambiente, a una velocidad de barrido ("scanning") de 20 nm/min, con un tono ("pitch") de datos de 0,5 nm, tiempo de integración de 8 s y sensibilidad estándar.

Partículas subvisibles:

Se contaron las partículas subvisibles a través de la técnica de método de oscurecimiento luminoso usando un contador de partículas Pamas SVSS-C. Se diluyeron las muestras cinco veces con agua purificada para obtener un volumen final de al menos 25 mL para la prueba.

Actividad Biológica:

Para los estudios de estabilidad a largo plazo descritos en el Ejemplo 5, se midió la actividad biológica como un parámetro adicional de estabilidad.

El método usado se basa en la capacidad de Avelumab, absorbido en una placa ELISA, de unirse en forma dependiente de la dosis a su antígeno PD-L1 presente en la línea celular HEK-293 (hPDL1, permanentemente transfectado con PD-

L1). Las dosis usadas fueron 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,12 ng/mL. De los datos obtenidos, se calcularon los valores EC₅₀. La actividad biológica (potencia) de las muestras se expresa como el porcentaje de bioactividad de la muestra contra el patrón y se calcula de la siguiente manera: Potencia (muestra) [%] = (EC₅₀ (muestra) / EC₅₀ (patrón)) * 100.7.

5 Métodos de fabricación

La presente invención provee además un método de fabricación de una formulación farmacéutica acuosa según lo definido en la presente. El método comprende adecuadamente mezclar en forma conjunta, en cualquier orden particular que sea considerado apropiado, cualquiera de los componentes relevantes requeridos para formar la formulación farmacéutica acuosa. El experto en la técnica puede consultar los ejemplos o técnicas bien conocidos en el campo técnico para formar formulaciones farmacéuticas acuosas (especialmente aquellas para inyección mediante jeringa, o infusión i.v.).

El método puede implicar, en primer lugar, preparar una premezcla (o pre-disolución) de algunos o todos los componentes (opcionalmente con algo o todo el diluyente) excluyendo Avelumab, y Avelumab mismo puede luego mezclarse (opcionalmente con o disolverse previamente en algo del diluyente) con la premezcla (o pre-disolución) para proporcionar la formulación farmacéutica acuosa, o una composición a la cual luego se le agregan los componentes finales para proporcionar la formulación farmacéutica acuosa final. Preferentemente, el método involucra formar un sistema tamponante, adecuadamente un sistema tamponante que comprende un agente tamponante según lo definido en esta invención. El sistema tamponante es formado, adecuadamente, en una premezcla con anterioridad a la adición de Avelumab. El sistema tamponante puede ser formado a través del simple mezclado del agente tamponante (suministrado listo para su uso) con su conjugado ácido/base (adecuadamente en cantidades relativas apropiadas para proporcionar el pH deseado – el mismo puede ser determinado por el experto en la técnica ya sea teóricamente o experimentalmente). En el caso de un sistema tamponante de acetato, esto quiere decir, por ejemplo, mezclar acetato sódico con HCl, o mezclar ácido acético con NaOH o con acetato. El pH de la premezcla de la formulación farmacéutica acuosa final puede ajustarse criteriosamente agregando la cantidad requerida de base o de ácido, o una cantidad de agente tamponante o conjugado ácido/base.

En ciertas realizaciones, el agente tamponante y/o sistema tamponante es formado previamente como una mezcla separada, y se transfiere el sistema tamponante a un precursor de la formulación farmacéutica acuosa (que comprende algunos o todos los componentes guardados para el agente tamponante y/o sistema tamponante, que comprende adecuadamente Avelumab y potencialmente solamente Avelumab) por medio de intercambio de tampón (por ejemplo usando diafiltración hasta que se alcanzan las concentraciones relevantes o la osmolalidad). Más adelante pueden agregarse excipientes adicionales, en caso necesario, a fin de producir la composición farmacéutica líquida final. Se puede ajustar el pH una vez o antes de que todos los componentes estén presentes.

Cualquiera, algunos o todos los componentes pueden ser disueltos o mezclados previamente con un diluyente con anterioridad al mezclado con otros componentes.

La formulación farmacéutica acuosa final se puede filtrar, adecuadamente para eliminar la materia particulada. Adecuadamente, la filtración se realiza a través de filtros con tamaño de 1 µm o más pequeños, adecuadamente de 0,22 µm. Adecuadamente, la filtración se realiza a través de filtros PES o filtros PVDF, adecuadamente con filtros PES de 0,22 µm.

El experto en la técnica sabe como una formulación farmacéutica acuosa se puede usar para preparar una disolución IV, de tal modo que la sustancia farmacológica del anticuerpo pueda ser administrada por vía intravenosa.

La preparación de la disolución IV en general consiste en una cierta cantidad de disolución que se extrae de las bolsas de disolución salina (por ejemplo 0,9% o 0,45% de disolución salina) con una jeringa de plástico (PP) y una aguja y se reemplaza con formulación farmacéutica acuosa. La cantidad de disolución reemplazada dependerá del peso corporal de los pacientes.

Ejemplo 1 – Estructura de Avelumab

45 1.1 Estructura Primaria

Avelumab es una IgG con dos moléculas de cadena pesada y 2 de cadena ligera. Las secuencias de aminoácidos de las dos cadenas se muestran en las Figuras 1a (SEQ ID NO:1) / 1b (SEQ ID NO:2) y 2 (SEQ ID NO:3), respectivamente.

1.2 Estructura Secundaria

Se usaron métodos de LC-MS y MS/MS para confirmar las cadenas intactas de la molécula y la presencia de modificaciones postraduccionales a las proteínas. La estructura secundaria de las subunidades de moléculas de Avelumab se muestra en la Figura 3.

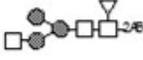
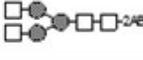
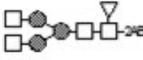
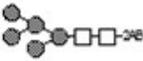
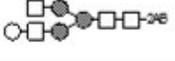
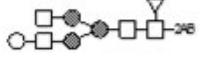
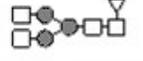
Según lo confirmado mediante espectrometría de masas UPLC-Q-TOF de péptidos obtenidos mediante digestión de tripsina, los enlaces disulfuro Cys21-Cys96, Cys21-Cys90, Cys147-Cys203, Cys138-Cys197, Cys215-Cys223, Cys229-Cys229, Cys232-Cys232, Cys264-Cys324 y Cys370-Cys428 están formando los nueve patrones de unión de IgG típicos.

1.3 Glicosilación

La molécula contiene un sitio de N-glicosilación en Asn300 de la cadena pesada. Según lo determinado mediante mapeo de péptidos, la estructura principal identificada por MALDI-TOF era un oligosacárido fucosilado en el núcleo tipo biantenarico complejo con cero (G0F), uno (G1F), o dos residuos de galactosa (G2F). Las especies principales son G0F y G1F. La fluorescencia de los glicanos de Avelumab rotulados mediante 2-aminobenzamida se ha analizado mediante HILIC-UPLC-ESI-Q-TOF. La Figura 4 muestra el perfil UPLC de las especies de glicanos encontradas.

5

Tabla 1: Identificación de pico de cromatograma HILIC-UPLC de 2AB

Pico	RT (min)	PM medido	PM esperado	Identificación	nomenclatura Oxford	Identificación por
1a	5.99	1380.52 (M+H)	1380.54 (M+H)		FA1	Manualmente identificado por MS
2	6.01	1437.54	1437.56		A2	Manualmente identificado por MS
3	7.02	1583.74 (M+H)	1583.62 (M+H)		FA2	MS fragmentación en fuente por GlycoworkBench
4	7.77	1355.57 (M+H)	1355.51 (M+H)		M5	Manualmente identificado por MS
5	8.16	1599.77 (M+H)	1599.62 (M+H)		A2G1	Manualmente identificado por MS
6	9.82	1744.79	1744.67		FA2G1	MS fragmentación en fuente por GlycoworkBench
		1462.90	1462.54		FA2 freeEnd	GlycoworkBench identificado por MS

7	10.07	1744.80	1744.67		FA2G1	MS fragmentación en fuente mediante GlycoworkBench
		1462.91	1462.54		FA2 freeEnd	GlycoworkBench identificado por MS
8	10.44	1462.90	1462.54		FA2 freeEnd	GlycoworkBench identificado por MS
		1744.79	1744.67		FA2G1	Identificado manualmente por MS
9	12.15	1177.50 (M+H)	1177.46 (M+H)		FM3	GlycoworkBench identificado por MS
10	16.66	Sin ionización	Sin ionización			
11	13.42	1906.33	1906.72		FA2G2	MS fragmentación en fuente por GlycoworkBench
		1624.71	1624.59		FA2G1 freeEnd	GlycoworkBench identificado por MS
12	13.71	954.40 (M+2H)/2	954.36 (M+2H)/2		FA2G2	Identificado manualmente por MS
		1626.69	1626.61		FA2G1 redEnd	GlycoworkBench identificado por MS
13	17.46	1099.97 (M+2H)/2	1099.91 (M+2H)/2		FA2G2S	MS fragmentación en fuente por GlycoworkBench
14	18.54	1079.91 (M+2H)/2	1079.86 (M+2H)/2		FA2G2S freeEnd+S (trazas pequeñas probables)	Identificado manualmente por MS
15	21.04	2489.05	2488.91		FA2G2S2	Identificado manualmente por MS

Las formas geométricas que representan los bloques de construcción de glicanos corresponden a las siguientes entidades moleculares:

5



Man: manosa, Fuc: fucosa, Gal: galactosa, GalNAc: N-Acetilgalactosamina, NANA: ácido siálico, NGNA: ácido N-glicolilneuramínico

10

La nomenclatura de glicanos usada corresponde a la Notación Oxford según lo propuesto por Harvey et al. (Proteomics 2009, 9, 3796-3801). En especies que contienen fucosa (FA2, FA2G1, FA2G2), la conectividad Fuc-GlcNAc es α 1-6. En las especies que tienen un GlcNAc terminal, la conectividad GlcNAc-Man es β 1-2. En las especies que contienen galactosa, la conectividad Gal-GlcNAc es β 1-4.

El perfil cromatográfico reportado ha sido integrado y proporcionó la Distribución de Especies de Glicanos de Avelumab según se muestra en la Tabla 2a.

Tabla 2a

A2	FA2	A2G1	FA2G1	A2G2	FA2G2	M5**
3.6	48.7	3.4	35.6	2.3	5.4	1.0
** Probablemente Manosa 5, coelución con especies mono-galactosiladas biantenarias						

5 El análisis del mapeo de glicanos confirmó la identificación llevada a cabo por el mapeo de péptidos (que permitió la identificación de las dos especies principales de glicanos), adicionalmente, se caracterizaron además mediante este método especies secundarias y menores, específicas para el análisis de glicanos.

En otra medición, se observó la siguiente Distribución de Especies de Glicanos.

Tabla 2b:

A2	FA2	A2G1	FA2G1	A2G2	FA2G2
4.0	50.2	1.0	30.0	0,1	5.6

10

Ejemplo 2 – Selección de DoE1

Una primera selección de un Diseño de Experimento DoE1 a 10 mg/mL de Avelumab evaluó el impacto de diversos factores tales como tipo variable de tampón /pH, excipientes, tipo de tensioactivo y concentración relevante. El estudio condujo a la selección de las condiciones óptimas las cuales pueden aumentar al máximo la estabilidad proteica.

15 En DoE1 se tuvieron en cuenta los siguientes factores para la investigación:

- Tipo de tampón y pH: amortiguadores de acetato, citrato e histidina a ser evaluados en el intervalo de pH 5.0 – 6.0.
- Excipientes: 3 excipientes diferentes fueron considerados a fin de brindar indicaciones en cuanto a si se deben preferir los azúcares/polioles o los aminoácidos para la mezcla en la fórmula,
- Tipo de tensioactivo y concentración: dos tensioactivos alternativos (Tween 20 y Poloxámero 188) a ser evaluados en concentraciones variables (0 – 1 mg/mL).

20

El estudio se llevó a cabo en viales DIN6R (Schott) a una concentración proteica de 10 mg/mL con volúmenes de llenado de 8 mL (80 mg/vial).

La Tabla 3 ilustra la selección de las formulaciones de DoE1 investigadas.

DoE1 permitió la realización de una selección de tampón/pH, tipo de excipientes y tipo de tensioactivos adecuados, que se usaron para el posterior estudio de DoE2 descrito en el Ejemplo 3.

25

Tabla 3: formulaciones de la selección del DoE1

ID	Avelumab (mg/mL)	pH	Tampón (10 mM)	Excipiente	Tensioactivo	Concentración de tensioactivo (mg/mL)
DoE1-1	10	5,00	Acetato	Manitol (51 mg/mL ¹)	Poloxámero 188	0,5
DoE1-2	10	5,00	Acetato	Trehalosa dihidratada (106 mg/mL ¹)	Tween 20	0,5
DoE1-3	10	5,00	Citrato	Manitol (51 mg/mL ¹)	Poloxámero 188	0,2

ES 2 823 279 T3

DoE1-4	10	5,25	Acetato	Trehalosa dihidratada (106 mg/mL ¹)	Tween 20	0,2
DoE1-5	10	5,25	Acetato	Arginina HCl (21,1 mg/mL ²)+ Ácido glutámico (7,4 mg/mL ³)	Poloxámero 188	0,2
DoE1-6	10	5,25	Citrato	Arginina HCl (21,1 mg/mL ²)+ Ácido glutámico (7,4 mg/mL ³)	-	-
DoE1-7	10	5,25	Citrato	Manitol (51 mg/mL ¹)	Tween 20	0,2
DoE1-8	10	5,50	Acetato	Manitol (51 mg/mL ¹)	Tween 20	0,5
DoE1-9	10	5,50	Acetato	Trehalosa dihidratada (106 mg/mL ¹)	-	-
DoE1-10	10	5,50	Citrato	Trehalosa dihidratada (106 mg/mL ¹)	Poloxámero 188	1
DoE1-11	10	5,50	Citrato	Arginina HCl (21,1 mg/mL ²)+ Ácido glutámico (7,4 mg/mL ³)	Tween 20	0,2
DoE1-12	10	5,75	Citrato	Trehalosa dihidratada (106 mg/mL)	Tween 20	1
DoE1-13	10	5,75	Citrato	Manitol (51 mg/mL)	-	-
DoE1-14	10	5,75	Histidina	Arginina HCl (21,1 mg/mL)+ Ácido glutámico (7,4 mg/mL)	Poloxámero 188	0,5
DoE1-15	10	5,75	Histidina	Manitol (51 mg/mL)	Tween 20	1
DoE1-16	10	6,00	Citrato	Arginina HCl (21,1 mg/mL)+ Ácido glutámico (7,4 mg/mL)	Tween 20	1
DoE1-17	10	6,00	Citrato	Trehalosa dihidratada (106 mg/mL)	Poloxámero 188	0,2
DoE1-18	10	6,00	Histidina	Arginina HCl (21,1 mg/mL)+ Ácido glutámico (7,4 mg/mL)	Poloxámero 188	1
DoE1-19	10	6,00	Histidina	Trehalosa dihidratada (106 mg/mL)	Poloxámero 188	0,5
Referencia ⁴	10	5,50	Acetato	Manitol (51 mg/mL)/L-Metionina (0,21 mg/mL)	Tween 20	0,5
(1) Corresponde a 280 mM						
(2) Corresponde a 150 mM						
(3) Corresponde a 50 mM						
(4) Formulación descrita en el documento WO2013079174						

2.1 Fabricación

Se le intercambió el tampón a la sustancia farmacológica formulada previamente (DS, por sus siglas en inglés) (10 (± 1) mg/mL de Avelumab, 1,36 mg/mL de Acetato sódico trihidrato, 51 mg/mL de D-Manitol, 0,21 mg/mL de L-Metionina, ácido clorhídrico c.s. hasta pH 5,5) mediante filtración de flujo tangencial (usando Casetes Pellicon XL Biomax con un corte de 10 kDa) en los tres tampones: acetato de sodio 10 mM pH 5.0, citrato de sodio 10 mM pH 5.0 e histidina 10 mM pH 5.75

hasta que se logró un intercambio de tres veces el volumen. En cada etapa, se diluyó la disolución DS 5 veces con tampón relevante. La concentración proteica objetivo final en el material DS intercambiado fue de > 10 mg/mL. Luego se agregaron los excipientes requeridos al material DS con intercambio de tampón relevante, se ajustó el pH y el peso final de la disolución al objetivo de modo de obtener las composiciones del producto farmacológico (DP) enumeradas en la Tabla 3.

5 La secuencia de adición de los componentes a las disoluciones de DS intercambiadas fue el siguiente:

Agregar D-Manitol o trehalosa dihidratada o Arginina HCl + Ácido glutámico a la disolución DS intercambiada, agitar hasta la completa disolución, agregar L-Metionina y agitar hasta la completa disolución (solamente para Referencia), agregar Poloxámero 188 o Polisorbato 20 (50 mg/mL de disolución inicial), agitar hasta la completa disolución, controlar el pH y ajustar hasta el objetivo con hidróxido de sodio.

10 Se cargaron disoluciones de producto farmacológico (DP, por sus siglas en inglés) (8 mL) en viales DIN6R (Schott).

La inspección visual durante el proceso de diafiltración de la sustancia farmacológica (DS, por sus siglas en inglés) describió que el tampón de citrato de sodio causó generalmente opalescencia más alta, mientras que se obtuvieron soluciones notablemente más claras cuando se realizaron los intercambios en tampones de acetato de sodio y en histidina.

15 En la Tabla 4, se muestran los resultados de los experimentos que se llevaron a cabo para determinar la recuperación proteica, osmolalidad (Osmomat 030/D, Gonotec) y turbidez de los tres materiales de sustancia farmacológica (DS) tras el intercambio de tampones. Se obtuvieron recuperaciones proteicas satisfactorias (> 89%) y valores finales de osmolalidad (< 61 mOsm/kg). Los análisis de turbidez confirmaron la opalescencia más alta de la sustancia farmacológica (DS) intercambiada en citrato sódico.

20 Tabla 4: Resultados de experimentos de recuperación (por OD), osmolalidad y turbidez llevados a cabo sobre materiales de sustancia farmacológica (DS) luego del intercambio de tampón.

Tampón	Recuperación (%)	Osmolalidad (mOsm/kg)	Turbidez (NTU)
Acetato	96	29	3
Citrato	89	38	30
Histidina	93	61	6

2.2. Osmolalidad

25 Los valores de osmolalidad de las formulaciones del producto farmacológico (DP) relevantes para la selección del DoE1 estaban comprendidos dentro del intervalo 299 – 396 mOsm/kg, la mayoría de las formulaciones tenían osmolalidades por debajo de alrededor de 360 mOsm/kg.

Las mediciones se llevaron a cabo en tiempo 0, tras la terminación de la fabricación.

Los valores obtenidos se ajustaban al objetivo (intervalo aceptable 250 – 400 mOsm/Kg). Soluciones que contienen trehalosa dihidratada que muestran valores más altos (cerca de 400 mOsm/kg) debido al efecto de este ingrediente sobre el punto de congelación y posterior aumento (aparente) de la osmolalidad.

30 2.3 Estrés térmico

2.3.1 Contenido proteico

Según lo determinado por mediciones de la OD, los valores de contenido en tiempo 0 se ajustaban a los valores teóricos (10 mg/mL). No se observaron cambios significativos después de 1 mes a 40°C.

2.3.2 Agregados totales

35 Se determinaron los agregados totales de las formulaciones del DoE1 mediante SE-HPLC en tiempo 0 y después de 2 y 4 semanas de almacenamiento a 40°C.

No se pudo resaltar ninguna variación estadísticamente significativa en términos de agregados tras el estrés térmico a 40°C, lo cual indica que las diferentes matrices ensayadas condujeron a cambios invariables/insignificantes en el patrón de agregación.

40 2.3.3 Fragmentación

Se determinó la fragmentación mediante Bioanalizador (2100 Bioanalyzer, Agilent) en formulaciones de DoE1 en tiempo 0 y después de 2 y 4 semanas de almacenamiento a 40°C.

Los datos indicaron que:

- 5 - el pH es un factor importante para la fragmentación proteica a 40°C. A pH > 5,75, la fragmentación tiende a aumentar en forma significativa (más típicamente en formulaciones de DoE1-13 a DoE1-19, en tampones de citrato e histidina).
- Las formulaciones que presentan las variaciones más bajas en la fragmentación son aquellas en un intervalo de pH de 5.0 – 5.75 preferentemente en presencia de D-Manitol o trehalosa dihidratada (DoE1-2 – 8 – 9 – 10 – 12).
- 10 - La formulación DoE1 – 7 (tampón de citrato a pH 5,25, en presencia de D-Manitol y Tween 20) presentó perfiles anormales con duplicación de picos consistentes (algunos problemas podrían estar relacionados con el uso de citrato como agente tamponante en términos de fragmentación, además de aquellos ya resaltados durante la fabricación con el aumento de la turbidez/opalescencia).

2.3.4 Turbidez

Se determinó la turbidez mediante nefelometría en formulaciones de DoE1 en tiempo 0 y después de 2 y 4 semanas de almacenamiento a 40°C.

- 15 Se observó consistentemente opalescencia / fuerte opalescencia en todas las formulaciones del producto farmacológico (DP) que contenían citrato como un agente tamponante del pH.

Se descubrió que todas las formulaciones en acetato sódico e histidina eran claras/ ligeramente opalescentes sin cambio significativo alguno observado durante 1 mes de almacenamiento a 40°C.

2.3.5 pH

- 20 No se observaron cambios en el pH.

2.4 Estrés mecánico

Las formulaciones de DoE1 fueron objeto de agitación orbital durante 24 horas en viales a 300 rpm (temperatura ambiente). Tras la terminación del estrés, se analizaron las muestras para determinar los agregados y la opalescencia.

2.4.1 Agregados totales

- 25 Se determinaron los agregados totales mediante SE-HPLC después del estrés mecánico y se compararon con los resultados en tiempo 0. Se observaron cambios insignificantes.

2.4.2 Turbidez

- 30 Se determinó la turbidez de las formulaciones del DoE1 mediante nefelometría (2100AN IS, Hach Lange) después del estrés mecánico y se comparó con los resultados en tiempo 0. Se evaluaron los datos mediante ANOVA y se observó un impacto moderadamente significativo que deriva de la presencia de tensioactivo (0,01 < valor p < 0,05). Ya sea Tween 20 o Poloxámero 188 puede ayudar a reducir al mínimo los cambios en la turbidez después del estrés mecánico.

2.5 Exposición luminosa

- 35 Las formulaciones del DoE1 fueron objeto de irradiación durante 7 horas a 765W/m² (Suntest CPS, Atlas). Luego de la terminación del estrés luminoso, se analizaron las muestras para determinar el perfil de agregados, opalescencia, pH e isoformas.

2.5.1 Agregados totales

Se observaron ligeras variaciones empleando SE-HPLC (Alliance, Waters), con mayor frecuencia cuando se usa tampón de citrato sódico (valor p < 0,01).

Se deben preferir los tampones de acetato sódico e histidina a fin de reducir al mínimo los cambios en la agregación.

- 40 2.5,2 Turbidez

Según lo determinado mediante nefelometría, los aumentos en la turbidez más evidentes fueron encontrados en general en tampón de citrato a valores de pH > 5,75 (DoE1-13 y DoE1-16 y DoE1-17).

2.5.3 pH

No se observaron cambios.

- 45 2.6 DoE1: resultado

Se evaluaron los datos obtenidos en el marco del estrés térmico, mecánico y luminoso a fin de determinar las condiciones que proporcionan máxima resistencia proteica contra los estreses.

Los resultados del análisis se informan en la Tabla 5.

Tabla 5: Componentes de formulaciones de Avelumab altamente estabilizadas a 10 mg/mL de concentración proteica

ID n.º	Tampón	pH	Excipiente	Tensioactivo
Extrapolada	Acetato 10 mM	5,20	Trehalosa dihidratada (280 mM)	Tween 20 (0,5 mg/mL)
DoE1-4	Acetato 10 mM	5,25	Trehalosa dihidratada (280 mM)	Tween 20 (0,2 mg/mL)

5

La formulación extrapolada es resaltada en verde (ID n.º = Extrapolada), mientras que la fórmula más similar en el conjunto de aquellas analizadas es DoE1-4, también informado.

Estos datos demuestran que el tampón de acetato pH 5,0 – 5,5 proporciona estabilidad proteica mejorada, y que la presencia de tensioactivo, tal como Tween 20 o Poloxámero 188, en concentraciones superiores a 0,2 mg/mL, es también importante para una estabilidad proteica mejorada en la formulación.

10

Ejemplo 3

Una segunda selección de DoE "DoE2" apuntó a un ajuste de las formulaciones seleccionadas luego de la compleción de DoE1 y aumento concurrente de la concentración proteica hasta 20 mg/mL.

Con esta segunda selección de formulaciones, se ensayaron seis formulaciones a una concentración proteica de 20 mg/mL que variaban en excipientes (D-Manitol, Trehalosa dihidratada) y tensioactivo (sin tensioactivo, Poloxámero 188 o Polisorbato 20 a 0,5 mg/mL) en presencia de tampón de acetato sódico 10 mM pH 5,2 luego del estrés térmico (1 mes a 40°C, 8 semanas a 25°C y 2-8°C) y agitación mecánica (24 horas a 300 rpm, temperatura ambiente). En la Tabla 6 se enumeran las composiciones relevantes.

15

Tabla 6: Formulaciones de la selección de DoE2 (concentración proteica = 20 mg/mL)

ID	Avelumab (mg/mL)	Tampón	Excipiente	Tensioactivo
DoE2 - 1	20	acetato 10 mM pH 5,2	Manitol (51 mg/mL ¹)	-
DoE2 - 2	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada (106 mg/mL ¹)	-
DoE2 - 3	20	acetato 10 mM pH 5,2	Manitol (51 mg/mL ¹)	Tween 20 (0,5 mg/mL)
DoE2 - 4	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada (106 mg/mL ¹)	Tween 20 (0,5 mg/mL)
DoE2 - 5	20	acetato 10 mM pH 5,2	Manitol (51 mg/mL ¹)	Poloxámero 188 (0,5 mg/mL)
DoE2 - 6	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada (106 mg/mL ¹)	Poloxámero 188 (0,5 mg/mL)
DoE1 - 8	20	acetato 10 mM pH 5,5	Manitol (51 mg/mL ¹)	Tween 20 (0,5 mg/mL)
Referencia	20	acetato 10 mM pH 5,5	Manitol (51 mg/mL)/L-Metionina (0,21 mg/mL)	Tween 20 (0,5 mg/mL)

20

El estudio de DoE2 se llevó a cabo para evaluar comparativamente el efecto de D-Manitol vs. trehalosa dihidratada, y el impacto de tensioactivo (ya sea Tween 20 o Poloxámero 188, o sin tensioactivo) en tampón de acetato sódico a pH 5,2, a la concentración proteica aumentada de 20 mg/mL. Se han incluido dos muestras de referencia de pH 5,5 en el diseño: "Referencia" con L-Metionina, y una formulación de referencia sin L-Metionina, correspondientes a DoE1-8.

3.1 Fabricación

Se usó la sustancia farmacológica (DS) previamente formulada (27,1 mg/mL de Avelumab en acetato sódico 10 mM pH 5,5). Luego se agregaron los excipientes requeridos al material de DS.

La secuencia de adición de los ingredientes a la disolución de DS fue el siguiente:

- 5 Agregar D-Manitol o trehalosa dihidratada, agitar hasta la completa disolución, agregar Poloxámero 188 o Polisorbato 20 (disolución inicial 20 mg/mL), agitar hasta la completa disolución, agregar L-Metionina y agitar hasta la completa disolución (solamente para Referencia), agitar hasta la completa disolución, controlar el pH y ajustar hasta el objetivo con hidróxido sódico o ácido acético diluido.

- 10 Se pesaron las soluciones ajustadas al objetivo con tampón relevante de modo de obtener las composiciones de DP enumeradas en la Tabla 7.

Se cargaron las disoluciones del DP (8 mL) en viales DIN6R.

3.2 Estrés térmico

3.2.1 Contenido proteico

- 15 No se observó cambio alguno del contenido proteico (OD, Lambda 35, Perkin Elmer) en el transcurso de 4 semanas a 40°C (Tabla 7) y 8 semanas a 25°C (Tabla 8).

Tabla 7: Contenido proteico (mg/mL) por OD de formulaciones de DoE2 (estrés térmico a 40°C)

n.º	ID	Conc. proteica (mg/mL)	Tampón	Excipiente (280 mM)	Tensioactivo	Tiempo 0	2 semanas (40°C)	4 semanas (40°C)
1	DoE2 - 1	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	No	22,3	20,0	20,9
2	DoE2 - 2	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	No	22,0	20,6	21,6
3	DoE2 - 3	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	Tween 20 (0,5 mg/mL)	21,9	20,5	21,6
4	DoE2 - 4	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	Tween 20 (0,5 mg/mL)	22,1	20,5	22,3
5	DoE2 - 5	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	Lutrol F-68 (0,5 mg/mL)	21,7	20,7	22,8
6	DoE2 - 6	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	Lutrol F-68 (0,5 mg/mL)	22,7	21,3	22,5
7	DoE1 - 8	20	acetato 10 mM pH 5,5	D-Manitol	Tween 20 (0,5 mg/mL)	21,5	20,5	23,5
8	Referencia	20	acetato 10 mM pH 5,5	D-Manitol + L-Metionina	Tween 20 (0,5 mg/mL)	21,5	20,4	23,3

Tabla 8: Contenido proteico (mg/mL) por OD de formulaciones de DoE2 (estrés térmico a 25°C)

n.º	ID	Conc. proteica (mg/mL)	Tampón	Excipiente (280 mM)	Tensioactivo	Tiempo 0	8 semanas (25°C)
1	DoE2 - 1	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	No	22,3	20,6
2	DoE2 - 2	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	No	22,0	21,0
3	DoE2 - 3	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	Tween 20 (0,5 mg/mL)	21,9	21,3
4	DoE2 - 4	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	Tween 20 (0,5 mg/mL)	22,1	21,5
5	DoE2 - 5	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	Lutrol F-68 (0,5 mg/mL)	21,7	20,5
6	DoE2 - 6	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	Lutrol F-68 (0,5 mg/mL)	22,7	21,0
7	DoE1 - 8	20	acetato 10 mM pH 5,5	D-Manitol	Tween 20 (0,5 mg/mL)	21,5	21,1
8	Referencia	20	acetato 10 mM pH 5,5	D-Manitol + L-Metionina	Tween 20 (0,5 mg/mL)	21,5	21,2

3.2.2 Agregados totales

5 Los agregados totales determinados mediante SE-HPLC con respecto a la estabilidad a 40°C y 25°C son representados en las Figuras 6 y 7 respectivamente. Solamente se observaron cambios menores, insignificantes, en la agregación.

3.2.3 Fragmentación por Bioanalizador

Se evaluaron los fragmentos en el transcurso de 1 mes a 40°C y después de 2 meses a 25°C. Los resultados relevantes se muestran en la Figura 8 y en la Figura 9 respectivamente.

10 A 40°C, además de la formulación DoE2-1, la cual presentó una cantidad de fragmentos superiores al 7% después de 1 mes, se observó que las otras formulaciones tenían un comportamiento similar (4-6% en fragmentos después de 1 mes) con eficacias ligeramente mejores de las formulaciones DoE2-4, DoE2-5 y DoE2-6 (4,0 – 4,5% en fragmentos después de 1 mes a 40°C).

A 25°C, se encontraron porcentajes similares de fragmentación después de 2 meses (4,6 – 6,1%)

3.2.4 Perfil de las isoformas

15 Se determinó el perfil de las isoformas mediante iCE280 (Fast IEF Analyzer, Convergent Bioscience) en las formulaciones DoE2 en tiempo 0 y después de 4 semanas de almacenamiento a 40°C. Luego del almacenamiento a 40°C se pueden determinar aumentos típicos en el agrupamiento ácido, mientras que se observa una disminución concurrente en las isoformas básicas.

20 Se evaluaron los perfiles de las isoformas en el transcurso de 1 mes a 40°C (Tabla 9) y después de 8 semanas a 25°C (Figura 10).

Se observaron variaciones comparables en todas las muestras en ambas condiciones de estrés.

Tabla 9: Resultados de iCE280 para las formulaciones de DoE2 después de 4 semanas a 40°C

	Tiempo 0			4 semanas a 40°C		
	Formas ácidas (%)	Pico principal (%)	Formas básicas (%)	Formas ácidas (%)	Pico principal (%)	Formas básicas (%)
DoE2 - 1	32,3	36,0	31,7	40,3	31,9	27,8
DoE2 - 2	32,0	37,7	30,4	38,0	33,6	28,5
DoE2 - 3	32,2	36,7	31,1	39,9	32,7	27,5
DoE2 - 4	32,7	36,7	30,6	39,7	33,0	27,3
DoE2 - 5	32,5	37,4	30,2	38,1	33,4	28,5
DoE2 - 6	32,4	37,0	30,7	38,3	33,7	28,0
DoE1 - 8	33,2	36,9	30,0	38,8	33,5	27,7
Referencia	32,2	36,2	31,7	37,7	33,4	28,9

3.2.6 Turbidez

No se observaron variaciones después de 1 mes a 40°C (Tabla 8) y después de 2 meses a 25°C (Tabla 9).

5

Tabla 10: Turbidez de las formulaciones de DoE2 después de 1 mes a 40°C

n.º	ID	Conc. proteica (mg/mL)	Tampón	Excipiente (280 mM)	Tensioactivo	Tiempo 0	2 semanas (40°C)	4 semanas (40°C)
1	DoE2 - 1	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	No	2	2	2
2	DoE2 - 2	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	No	2	2	2
3	DoE2 - 3	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	Tween 20 (0,5 mg/mL)	2	2	2
4	DoE2 - 4	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	Tween 20 (0,5 mg/mL)	2	2	2
5	DoE2 - 5	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	Lutrol F-68 (0,5 mg/mL)	2	2	2
6	DoE2 - 6	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	Lutrol F-68 (0,5 mg/mL)	2	2	2
7	DoE1 - 8	20	acetato 10 mM pH 5,5	D-Manitol	Tween 20 (0,5 mg/mL)	2	2	2
8	Referencia	20	acetato 10 mM pH 5,5	D-Manitol + L-Metionina	Tween 20 (0,5 mg/mL)	3	3	2

Tabla 11: Turbidez de las formulaciones del DoE2 después de 2 meses a 25°C

n.º	ID	Conc. proteica (mg/mL)	Tampón	Excipiente (280 mM)	Tensioactivo	Tiempo 0	8 semanas (25°C)
1	DoE2 - 1	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	No	2	2
2	DoE2 - 2	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	No	2	2
3	DoE2 - 3	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	Tween 20 (0,5 mg/mL)	2	2
4	DoE2 - 4	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	Tween 20 (0,5 mg/mL)	2	2
5	DoE2 - 5	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	Lutrol F-68 (0,5 mg/mL)	2	2
6	DoE2 - 6	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	Lutrol F-68 (0,5 mg/mL)	2	2
7	DoE1 - 8	20	acetato 10 mM pH 5,5	D-Manitol	Tween 20 (0,5 mg/mL)	2	3
8	Referencia	20	acetato 10 mM pH 5,5	D-Manitol + L-Metionina	Tween 20 (0,5 mg/mL)	3	3

3.2.7 pH

No se observaron variaciones después de 1 mes a 40°C (Tabla 12) y después de 2 meses a 25°C (Tabla 13).

5

Tabla 12: pH de formulaciones de DoE2 después de 1 mes a 40°C

n.º	ID	Conc. proteica (mg/mL)	Tampón	Excipiente (280 mM)	Tensioactivo	Tiempo 0	2 semanas (40°C)	4 semanas (40°C)
1	DoE2 - 1	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	No	5,2	5,2	5,2
2	DoE2 - 2	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	No	5,2	5,2	5,2
3	DoE2 - 3	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	Tween 20 (0,5 mg/mL)	5,2	5,2	5,2
4	DoE2 - 4	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	Tween 20 (0,5 mg/mL)	5,2	5,2	5,2
5	DoE2 - 5	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	Lutrol F-68 (0,5 mg/mL)	5,2	5,2	5,2
6	DoE2 - 6	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	Lutrol F-68 (0,5 mg/mL)	5,2	5,2	5,2
7	DoE1 - 8	20	acetato 10 mM pH 5,5	D-Manitol	Tween 20 (0,5 mg/mL)	5,5	5,5	5,5
8	Referencia	20	acetato 10 mM pH 5,5	D-Manitol + L-Metionina	Tween 20 (0,5 mg/mL)	5,5	5,5	5,5

Tabla 13: pH de formulaciones de DoE2 después de 2 meses a 25°C

n.º	ID	Conc. proteica (mg/mL)	Tampón	Excipiente (280 mM)	Tensioactivo	Tiempo 0	8 semanas (25°C)
1	DoE2 - 1	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	No	5,2	5,2
2	DoE2 - 2	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	No	5,2	5,2
3	DoE2 - 3	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	Tween 20 (0,5 mg/mL)	5,2	5,3
4	DoE2 - 4	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	Tween 20 (0,5 mg/mL)	5,2	5,2
5	DoE2 - 5	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	Lutrol F-68 (0,5 mg/mL)	5,2	5,2
6	DoE2 - 6	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	Lutrol F-68 (0,5 mg/mL)	5,2	5,2
7	DoE1 - 8	20	acetato 10 mM pH 5,5	D-Manitol	Tween 20 (0,5 mg/mL)	5,5	5,5
8	Referencia	20	acetato 10 mM pH 5,5	D-Manitol + L-Metionina	Tween 20 (0,5 mg/mL)	5,5	5,6

3.2.8 Dicroísmo circular

5 Se recopilaron los espectros del dicroísmo circular (CD) (J-810 Espectropolarímetro, Jasco) de las formulaciones del DoE2 en tiempo 0 y después de 4 semanas a 40°C y 8 semanas a 25°C en el intervalo de UV cercano. La proteína en toda la formulación generalmente retiene su estructura terciaria después de 4 semanas a 40°C y 8 semanas a 25°C.

3.2.9 Partículas subvisibles

10 Se determinaron las partículas subvisibles de las formulaciones del DoE2 después de 8 semanas de almacenamiento a 2-8°C. Los resultados se muestran en la Tabla 14. Se encontraron los valores dentro de los límites de la Farmacopea Europea (para las soluciones suministradas en envases con un contenido nominal de menos de 100 mL).

Tabla 14: Partículas subvisibles de formulaciones de DoE2 después de 8 semanas a 2-8°C

n.º	ID	Conc. proteica (mg/mL)	Tampón	Excipiente (280 mM)	Tensioactivo	Partículas subvisibles > 10µm (por cada envase)	Partículas subvisibles > 25µm (por cada envase)
1	DoE2 - 1	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	No	754	33
2	DoE2 - 2	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	No	716	14
3	DoE2 - 3	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	Tween 20 (0,5 mg/mL)	597	24
4	DoE2 - 4	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	Tween 20 (0,5 mg/mL)	1839	100
5	DoE2 - 5	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	Lutrol F-68 (0,5 mg/mL)	431	38

6	DoE2 - 6	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	Lutrol F-68 (0,5 mg/mL)	521	28
7	DoE1 - 8	20	acetato 10 mM pH 5,5	D-Manitol	Tween 20 (0,5 mg/mL)	915	14
8	Referencia	20	acetato 10 mM pH 5,5	D-Manitol + L-Metionina	Tween 20 (0,5 mg/mL)	1873	52

3.3 Estrés mecánico

3.3.1 Fragmentación por Bioanalizador

5 Después de 24 horas a 300 rpm, se observaron ligeras variaciones en los fragmentos (Tabla 15) en todas las muestras (hasta 5,0 – 6,5%) sin relación específica alguna con las composiciones específicas ensayadas.

Tabla 15: Fragmentos (%) por Bioanalizador de formulaciones de DoE2 después de agitación durante 24 horas (300 rpm; temperatura ambiente)

n.º	ID	Conc. proteica (mg/mL)	Tampón	Excipiente (280 mM)	Tensioactivo	Tiempo 0	24 H 300 RPM
1	DoE2 - 1	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	No	4,9	5,5
2	DoE2 - 2	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	No	4,6	5,0
3	DoE2 - 3	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	Tween 20 (0,5 mg/mL)	4,7	5,7
4	DoE2 - 4	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	Tween 20 (0,5 mg/mL)	4,6	6,5
5	DoE2 - 5	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	Lutrol F-68 (0,5 mg/mL)	5,1	6,2
6	DoE2 - 6	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	Lutrol F-68 (0,5 mg/mL)	5,2	5,3
7	DoE1 - 8	20	acetato 10 mM pH 5,5	D-Manitol	Tween 20 (0,5 mg/mL)	3,5	5,4
8	Referencia	20	acetato 10 mM pH 5,5	D-Manitol + L-Metionina	Tween 20 (0,5 mg/mL)	3,4	5,4

3.3.2 Agregados

10 No se observaron cambios después de la agitación mecánica (Tabla 16).

Tabla 16: Agregados (%) mediante SE-HPLC de formulaciones de DoE2 después de agitación durante 24 horas (300 rpm; temperatura ambiente)

n.º	ID	Conc. proteica (mg/mL)	Tampón	Excipiente (280 mM)	Tensioactivo	Tiempo 0	24 H 300 RPM
1	DoE2 - 1	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	No	1,5	1,5
2	DoE2 - 2	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	No	1,5	1,5

ES 2 823 279 T3

3	DoE2 - 3	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	Tween 20 (0,5 mg/mL)	1,6	1,5
4	DoE2 - 4	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	Tween 20 (0,5 mg/mL)	1,6	1,5
5	DoE2 - 5	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	Lutrol F-68 (0,5 mg/mL)	1,6	1,5
6	DoE2 - 6	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	Lutrol F-68 (0,5 mg/mL)	1,6	1,6
7	DoE1 - 8	20	acetato 10 mM pH 5,5	D-Manitol	Tween 20 (0,5 mg/mL)	1,6	1,6
8	Referencia	20	acetato 10 mM pH 5,5	D-Manitol + L-Metionina	Tween 20 (0,5 mg/mL)	1,6	1,6

3.3.3 pH

No se observaron cambios después de la agitación mecánica (Tabla 17).

Tabla 17: pH de formulaciones de DoE2 después de agitación durante 24 horas (300 rpm; temperatura ambiente)

n.º	ID	Conc. proteica (mg/mL)	Tampón	Excipiente (280 mM)	Tensioactivo	Tiempo 0	24 H 300 RPM
1	DoE2 - 1	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	No	5,2	5,2
2	DoE2 - 2	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	No	5,2	5,2
3	DoE2 - 3	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	Tween 20 (0,5 mg/mL)	5,2	5,2
4	DoE2 - 4	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	Tween 20 (0,5 mg/mL)	5,2	5,2
5	DoE2 - 5	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	Lutrol F-68 (0,5 mg/mL)	5,2	5,2
6	DoE2 - 6	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	Lutrol F-68 (0,5 mg/mL)	5,2	5,2
7	DoE1 - 8	20	acetato 10 mM pH 5,5	D-Manitol	Tween 20 (0,5 mg/mL)	5,5	5,5
8	Referencia	20	acetato 10 mM pH 5,5	D-Manitol + L-Metionina	Tween 20 (0,5 mg/mL)	5,5	5,5

5

3.4 Turbidez

No se observaron cambios después de la agitación mecánica (Tabla 18).

Tabla 18: Turbidez (NTU) de formulaciones de DoE2 después de agitación durante 24 horas (300 rpm; temperatura ambiente)

n.º	ID	Conc proteica (mg/mL)	Tampón	Excipiente (280 mM)	Tensioactivo	Tiempo 0	24h 300 rpm
-----	----	-----------------------	--------	---------------------	--------------	----------	-------------

1	DoE2 - 1	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	No	2	2
2	DoE2 - 2	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	No	2	2
3	DoE2 - 3	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	Tween 20 (0,5 mg/mL)	2	2
4	DoE2 - 4	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	Tween 20 (0,5 mg/mL)	2	2
5	DoE2 - 5	20	acetato 10 mM pH 5,2	D-Manitol	Lutrol F-68 (0,5 mg/mL)	2	2
6	DoE2 - 6	20	acetato 10 mM pH 5,2	Trehalosa dihidratada	Lutrol F-68 (0,5 mg/mL)	2	2
7	DoE1 - 8	20	acetato 10 mM pH 5,5	D-Manitol	Tween 20 (0,5 mg/mL)	2	2
8	Referencia	20	acetato 10 mM pH 5,5	D-Manitol + L-Metionina	Tween 20 (0,5 mg/mL)	3	2

3.5 DoE2: resultado

Estos resultados demuestran que un pH 5,2 (extrapolado de DoE1) no tiene impacto alguno sobre la fragmentación y, por lo tanto, es adecuado para usar en una formulación estable. Se demostró que el pH óptimo para preservar la estabilidad proteica está dentro del intervalo entre 5,0 – 5,5 (DoE1). En contraste, los valores de pH de 5,6 – 5,7 podrían dar como resultado una fragmentación más elevada.

El manitol y la trehalosa dihidratada dieron como resultado un comportamiento similar.

No se encontró superioridad alguna del Poloxámero 188 con respecto al Tween 20.

Estos resultados demuestran además que la concentración proteica más elevada (20 mg/mL) en la formulación DoE2 es factible sin observar ni anticipar problemas de estabilidad.

DoE2: Se comparó la formulación 3 (la formulación más preferida y seleccionada finalmente para uso posterior a 20 mg/mL) en términos de perfiles de isoformas con la formulación de referencia en tiempo 0, después de 4 semanas a 40°C y 8 semanas a 25°C a fin de evaluar si hay diferente comportamiento entre las dos formulaciones con respecto al tiempo de estabilidad en condiciones diferentes. En la Tabla 19 se presentan los resultados.

Tabla 19: Perfiles de isoformas por iCE280 de Formulación 3 de DoE2 y formulación de referencia en tiempo 0, después de 4 semanas (40°C) y 8 semanas (25°C)

ID n.º	Tampón	pH	Excipiente	Tensioactivo	Agrupamiento	Tiempo 0	4 semanas (40°C)	8 semanas (25°C)
DoE2 - 3	acetato 10 mM	5,20	D-Manitol	Tween 20 (0,5 mg/mL)	1	1,6	3,1	2,9
					2	4,5	5,3	7,1
					3	9,9	10,8	9,1
					4	16,2	20,7	18,0
					5	36,7	32,7	34,9
					6	22,2	19,7	20,3
					7	8,9	7,8	7,7
Referencia		5,50			1	1,8	2,3	3,4

				2	4,3	5,0	8,1	
				3	9,8	10,6	10,0	
	acetato 10 mM		Manitol + L- Metionina	Tween 20 (0,5 mg/mL)	4	16,3	19,8	16,9
				5	36,2	33,4	34,7	
				6	22,6	21,1	19,6	
				7	9,1	7,8	7,4	

También el punto temporal adicional (8 semanas) a 25°C no resaltó problemas mayores que deriven del pH reducido con respecto a la formulación de referencia.

Ejemplo 4 - Efecto del antioxidante (L-Metionina)

5 Como se usó metionina en la formulación descrita en WO2013079174, el presente desarrollo de la formulación de Avelumab tuvo como objetivo aclarar también el impacto de este compuesto como un antioxidante.

10 Se diluyeron dos veces las muestras de 10 mg/mL (del conjunto de DoE1) con 200 µL de 6% H₂O₂, con lo cual se obtuvo una concentración proteica final de aproximadamente 5 mg/mL y 3% H₂O₂, y luego se incubaron durante 3h a 5°C. Al final de la incubación, se lavó la muestra contra agua mediante ultracentrifugación usando un Amicon Ultra (Millipore) 4 mL 10 kDa (4 lavados 1 mL cada etapa). La concentración proteica final después del tratamiento con Amicon era de aproximadamente 10 mg/mL.

15 DoE1: La Formulación 8 es idéntica a la formulación de Referencia de DoE2, excepto por la presencia de L-metionina: la oxidación forzada con H₂O₂ (3 horas a 2-8°C) de las dos formulaciones y posterior ensayo mediante iCE280 (la oxidación generalmente conduce a un aumento en especies más ácidas en electroferogramas) y el Bioanalizador apuntó a determinar si surge cualquier diferencia en las dos formulaciones debido a la presente del agente antioxidante. Los resultados son presentados en las Tablas 20 y 21.

Tabla 20: Perfiles de isoformas mediante iCE280 de Formulación 8 de DoE1 y de la formulación de Referencia después del tratamiento de oxidación forzada. Tabla superior: muestras almacenadas a 2-8°C. Tabla inferior: muestra almacenada durante 4 semanas a 40°C + 6 semanas a 2-8°C

ID n.º	Tampón	pH	Anti PD-L1 (mg/mL)	Excipiente	Tensioactivo	Agrupamiento	Oxidación con el 3% de H ₂ O ₂ (después de almacenamiento durante 10 semanas a 2-8°C)
DoE1 - 8	acetato 10 mM	5,50	10	Manitol (280 mM)	Tween 20 (0,5 mg/mL)	1	2,2
						2	4,5
						3	9,8
						4	23,2
						5	39,0
						6	16,6
						7	4,8
Referencia	acetato 10 mM	5,50	10	Manitol (280 mM) + L-	Tween 20 (0,5 mg/mL)	1	2,2
						2	4,5

				Metionina (1.4 mM)		3	10,1
						4	23,7
						5	37,9
						6	16,8
						7	4,8
DoE1 - 8	acetato 10 mM	5,50	10	Manitol (280 mM)	Tween 20 (0,5 mg/mL)	1	2,5
						2	5,9
						3	11,4
						4	27,2
						5	34,5
						6	14,6
						7	4,0
Referencia	acetato 10 mM	5,50	10	Manitol (280 mM) + L- Metionina (1.4 mM)	Tween 20 (0,5 mg/mL)	1	2,7
						2	5,9
						3	11,1
						4	26,7
						5	35,8
						6	14,4
						7	3,4

Se observaron abundancias de agrupamientos ácidos comparables para las dos formulaciones (con o sin metionina).

Se ensayaron además fragmentos mediante un Bioanalizador para estas muestras (Tabla 21): se observaron niveles comparables de fragmentación para las dos formulaciones (con o sin metionina).

- 5 Tabla 21: Fragmentos por Bioanalizador de Formulación 8 de DoE1 y formulación de Referencia después de tratamiento de oxidación forzada.

Tabla superior: muestras almacenadas a 2-8°C.							
Tabla inferior: muestra almacenada durante 4 semanas a 40°C + 6 semanas a 2-8°C							
ID n.º	Tampón	pH	Anti PD-L1 (mg/mL)	Excipiente	Tensioactivo	Oxidación con el 3% de H ₂ O ₂ (después de almacenamiento durante 10 semanas a 2-8°C)	
DoE1 - 8	acetato 10 mM	5,50	10	Manitol (280 mM)	Tween 20 (0,5 mg/mL)	2,4	

Referencia	acetato 10 mM	5,50	10	Manitol (280 mM) + L-Metionina (1.4 mM)	Tween 20 (0,5 mg/mL)	2,5
------------	---------------	------	----	---	----------------------	-----

ID n.º	Tampón	pH	Anti PD-L1 (mg/mL)	Excipiente	Tensioactivo	Oxidación con el 3% de H ₂ O ₂ (después de almacenamiento durante 4 semanas a 40°C + 6 semanas a 2-8°C)
DoE1 - 8	acetato 10 mM	5,50	10	Manitol (280 mM)	Tween 20 (0,5 mg/mL)	2,5
Referencia	acetato 10 mM	5,50	10	Manitol (280 mM) + L-Metionina (1.4 mM)	Tween 20 (0,5 mg/mL)	3,0

Estos resultados sugieren que no se necesita un antioxidante para estabilizar Avelumab y que, por lo tanto, puede ser omitido de la formulación.

5 **Ejemplo 5 – Estudios de estabilidad a largo plazo**

5.1 Composiciones y potencias del producto farmacológico

10 Las formulaciones 1, 2, 3, 4 y 5 de Avelumab enumeradas en la Tabla 22 se fabricaron y se usaron para un estudio de estabilidad a largo plazo. El proceso de fabricación incluyó un mezclado seguido por un paso de doble filtración de esterilización a través de una membrana de 0,22 µm (se ensayaron filtros PES y PVDF) antes del llenado final en los viales. La Formulación 5 corresponde a la Referencia usada también en los estudios de DoE-1 y -2 como se describe en los Ejemplos 2 y 3.

Tabla 22: Composiciones de DP

Componente(s)	Composiciones de DP				
	Formulación 1 (DP 01-190214)	Formulación 2 (DP 02-190214)	Formulación 3 (DP 03-180214)	Formulación 4 (DP 04-180214)	Referencia (DP 05-190214)
Avelumab	20 mg/mL	20 mg/mL	10 mg/mL	10 mg/mL	10 mg/mL
Tampón de acetato sódico	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
Manitol	51 mg/mL	0 mg/mL	51 mg/mL	0 mg/mL	51 mg/mL
Trehalosa dihidratada	0 mg/mL	106 mg/mL	0 mg/mL	106 mg/mL	0 mg/mL
Polisorbato 20	0,5 mg/mL	0,5 mg/mL	0,5 mg/mL	0,5 mg/mL	0,5 mg/mL
L-Metionina	0	0	0	0	1.4 mM
hidróxido sódico o ácido clorhídrico	c.s. hasta pH 5,2 ± 0,1	c.s. hasta pH 5,2±0,1	c.s. hasta pH 5,2±0,1	c.s. hasta pH 5,2±0,1	c.s. hasta pH 5,5±0,1
Volumen de llenado (en viales de vidrio Tipo I)	10 mL	10 mL	20 mL	20 mL	8 mL

15 Tras la fabricación (tiempo 0), se determinó la osmolalidad y se encontró que se ajustaba al valor esperado (intervalo: 320 – 350 mOsm/kg).

5.2 Plan y duración de estudios de estabilidad

Con respecto a la estabilidad de las formulaciones, en la Tabla 23 se sintetizan el plan de estudio, las condiciones de almacenamiento y los ensayos que serán aplicados. Para cada punto en el tiempo, la tabla indica la condición de almacenamiento que será ensayada.

- 5 Se ha llevado a cabo el almacenamiento de las muestras con los viales en la posición vertical. El estudio debe realizarse en el transcurso de 1 mes a 40°C, 6 meses en las condiciones aceleradas (a 25°C) y 12 meses en condiciones de largo plazo (2-8°C).

Tabla 23: Plan de Estabilidad

Ensayo	T=0	0,5 M (2 sem)	1 M (4 sem)	2 M (8 sem)	3 M (13 sem)	6 M (26 sem)	9M (39 sem)	12 M (52 sem)
Color	X	40°C	25°C 40°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C	2-8°C
Turbidez	X	40°C	25°C 40°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C	2-8°C
pH	X	40°C	25°C 40°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C	2-8°C
Contenido A280-A320	X	40°C	25°C 40°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C	2-8°C
SE-HPLC	X	40°C	25°C 40°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C	2-8°C
SDS-page red	X	40°C	25°C 40°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C	2-8°C
SDS-page no red	X	40°C	25°C 40°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C	2-8°C
iCE-280	X	40°C	25°C 40°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C	2-8°C
Osmolaridad	X	40°C	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Partículas subvisibles	X	40°C	25°C 40°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C	2-8°C
Potencia	X	40°C	25°C 40°C	N/A	2-8°C 25°C	2-8°C 25°C	2-8°C	2-8°C

- 10 Se recopilaron los datos a 40°C (hasta 1 mes), 25°C (hasta 6 meses) y 2-8°C (hasta 12 meses).

5.3 Estabilidad a 2-8°C

5.3.1 Grado de coloración mediante inspección visual

No se observan cambios en la estabilidad. Todas las soluciones permanecen más claras que la disolución estándar más clara (< Y7). Los valores se encuentran dentro de las especificaciones.

- 15 5.3.2 Grado de opalescencia por nefelometría

Todas las soluciones muestran una turbidez comprendida dentro del intervalo de las soluciones claras (1 - 3 NTU). Los valores se encuentran dentro de las especificaciones.

5.3.3 pH

5 No se observan cambios en la estabilidad. Todas las soluciones muestran valores de pH en línea con el objetivo ($5,2 \pm 0,1$ para las formulaciones 1 a 4 y $5,5 \pm 0,1$ para el DP de Referencia). Los valores se encuentran dentro de las especificaciones.

5.3.4 Contenido proteico mediante OD

10 Se encontró que la concentración de las formulaciones 1 y 2 (concentración objetivo = 20 mg/mL) estaba dentro del intervalo entre 18,7 – 19,8 mg/mL (dentro de $\pm 10\%$ de los límites con respecto al objetivo) durante el estudio, sin cambio significativo alguno con el transcurso del tiempo.

Se encontró que la concentración de las formulaciones 3 y 4 y el Producto Farmacológico de Referencia (concentración objetivo = 10 mg/mL) estaba dentro del intervalo entre 9,3 – 10,2 mg/mL durante el estudio; no se encontró cambio significativo alguno.

15 Por tanto, el contenido proteico permanece inalterado con estabilidad de 12 meses a 2-8 °C (Los valores se encuentran dentro de las especificaciones).

5.3.5 Dímeros y HMW por SE-HPLC

Sin cambios en la agregación en el transcurso de 12 meses a 2-8 °C con respecto al tiempo 0. Los valores se encuentran dentro de las especificaciones.

5.3.6 Fragmentos (LMW) por SDS-PAGE en condiciones no reductoras (N-Red)

20 Como se muestra en la Figura 11, las muestras mostraron un valor en tiempo 0 de LMW mediante SDS-PAGE N-RED en el intervalo 11,9 – 16,2 %, seguido por un aumento del + 5-7 % en el siguiente punto (8 semanas) y por cambios menores en el resto de la estabilidad, hasta seis meses.

5.3.7 Partículas subvisibles

25 Como para las partículas subvisibles por cada envase, los conteos estaban por debajo de los límites establecidos por la Farmacopea de los Estados Unidos, Europa y Japón para las soluciones para infusión o inyección con contenido nominal de menos de 100 mL (6000 por envase igual o superior a 10 μm y 600 por cada envase igual o más de 25 μm). Los gráficos de barras relevantes para los dos intervalos de tamaño de partícula se muestran en la Figura 12 y en la Figura 13 respectivamente para partículas subvisibles $\geq 10\ \mu\text{m}$ y partículas subvisibles $\geq 25\ \mu\text{m}$

No se destacó cambio alguno en las partículas subvisibles tras el almacenamiento.

30 5.3.8 Actividad biológica

Los valores de bioactividad estaban, en general, dentro del intervalo 89 – 110% para todos los puntos de tiempo ensayados en el transcurso del estudio de estabilidad. No se observó disminución alguna luego del almacenamiento.

5.3.9 Patrón de isoformas

35 Los resultados de los experimentos iCE280 son reportados en la Figura 14 (agrupamiento ácido, suma de picos 1-2-3-4), Figura 15 (pico principal) y Figura 16 (agrupamiento básico, suma de picos 6-7). Se retiene el perfil de isoformas a lo largo de todo el período de estabilidad de 12 meses. En las condiciones refrigeradas, no se observa impacto alguno del pH sobre las isoformas del anticuerpo.

5.3.10 Resultado de Estabilidad a 2-8°C

40 No se descubrió que ninguna de las propiedades físico-químicas de las cinco formulaciones ensayadas sufriera cambios significativos en el estudio de estabilidad de 12 meses a 2-8°C. Esto es sorprendente especialmente para los patrones de las isoformas, ya que en las formulaciones 1 a 4 no hay Metionina presente.

5.4 Estabilidad a 25°C

5.4.1 Grado de coloración mediante inspección visual

45 No se observan cambios en la estabilidad. Todas las soluciones permanecen más claras que la disolución estándar más clara (< Y7). Los valores se encuentran dentro de las especificaciones.

5.4.2 Grado de opalescencia mediante nefelometría

Todas las soluciones muestran turbidez comprendida entre 1 – 3 NTU (intervalo de soluciones claras). Los valores se encuentran dentro de las especificaciones.

5.4.3 pH

5 No se observan cambios en la estabilidad. Todas las soluciones muestran valores de pH que se ajustan al objetivo ($5,2 \pm 0,1$ para las formulaciones 1-2-3-4 y $5,5 \pm 0,1$ para el Producto Farmacológico de Referencia). Los valores se encuentran dentro de las especificaciones.

5.4.4 Contenido proteico mediante OD

10 Se encontró que la concentración de las formulaciones 1 y 2 (concentración objetivo = 20 mg/mL) estaba dentro del intervalo entre 18,5 – 20,0 mg/mL (dentro de $\pm 10\%$ de los límites con respecto al objetivo) durante el estudio, sin cambio significativo alguno con el transcurso del tiempo.

Se encontró que la concentración de las formulaciones 3 y 4 y el Producto Farmacológico de Referencia (concentración objetivo = 10 mg/mL) estaba dentro del intervalo entre 9,5 – 10,0 mg/mL durante el estudio; no se encontró cambio significativo alguno.

15 Por consiguiente, el contenido proteico permanece inalterado en el transcurso del estudio de estabilidad de seis meses a 25°C. Los valores se encuentran dentro de las especificaciones.

5.4.5 Dímeros y HMW mediante SE-HPLC

No se observó cambio alguno en la agregación durante seis meses a 25°C con respecto al tiempo 0. Se encontró a lo largo de todo el estudio una agregación inferior al límite de las especificaciones (no más del 5%).

5.4.6 Fragmentos LMW mediante SDS-PAGE N-Red

20 Las muestras mostraron un valor de tiempo 0 de Pesos Moleculares Más Bajos (LMW) mediante SDS-PAGE N-RED (en condiciones no reductoras) en el intervalo 11,9 – 16,2%, seguido por aumento por etapas en el siguiente punto (4 semanas) seguido por cambios menores en comparación con el resto de la estabilidad, hasta seis meses (Figura 17).

5.4.7 Partículas subvisibles

25 Como en el caso de las partículas subvisibles por cada envase, los conteos estaban por debajo de los límites establecidos por la Farmacopea de los Estados Unidos, Europa y Japón para las soluciones para infusión o inyección con un contenido nominal inferior a 100 mL (6000 por cada envase igual o superior a 10 μm y 600 por cada envase igual o superior a 25 μm). Los gráficos de barras relevantes se muestran en las Figuras 18 y 19.

No se resaltó cambio alguno en las partículas subvisibles luego de la estabilidad a 25°C.

5.4.8 Actividad biológica

30 En general, los valores de la bioactividad estaban en el intervalo 90 – 110% para todos los puntos de tiempo ensayados en el transcurso del estudio de estabilidad. No se observó disminución alguna luego de la estabilidad a 25°C.

5.4.9 Patrón de las isoformas

Los resultados de los experimentos iCE280 se informan en la Figura 20 (agrupamiento ácido, suma de picos 1-2-3-4), Figura 21 (pico principal) y Figura 22 (agrupamiento básico, suma de picos 6-7).

35 El agrupamiento ácido tiende a aumentar con el almacenamiento a 25°C. Todas las muestras exhiben aumento de agrupamientos ácidos de aproximadamente + 10% después de seis meses a 25°C y disminución concurrente en el pico principal (- 5% después de 6 meses) y agrupamiento básico (- 5% después de 6 meses).

5.4.10 Resultado de Estabilidad a 25°C

40 En el estudio de estabilidad de más de 6 meses a 25°C, las cinco formulaciones ensayadas no mostraron cambio alguno en términos de contenido proteico, apariencia, claridad, pH, agregados, partículas subvisibles y bioactividad con respecto al tiempo 0.

Se descubrió que los fragmentos aumentan en puntos de + 5 por ciento según SDS-PAGE N-RED después de seis meses a 25°C, mientras que no se resaltaron cambios estadísticamente significativos mediante Bioanalizador.

45 Un comportamiento similar en el perfil de las isoformas mediante iCE280: agrupamiento ácido de todas las formulaciones tiende a aumentar en +10% en el estudio de seis meses, con disminuciones concurrentes en el pico principal y en el agrupamiento básico.

5.5 Estabilidad a 40°C

5.5.1 Grado de coloración mediante inspección visual

No se observan cambios en la estabilidad. Todas las soluciones permanecen más claras que la disolución estándar más clara ($< Y7$).

5.5.2 Grado de opalescencia mediante nefelometría

5 No se observan cambios en la estabilidad. Todas las soluciones muestran turbidez compuesta por 2 NTU (intervalo de soluciones claras). Los valores se encuentran dentro de las especificaciones.

5.5.3 pH

10 No se observan cambios en la estabilidad. Todas las soluciones muestran valores de pH que se ajustan al objetivo ($5,2 \pm 0,1$ para las formulaciones 1-2-3-4 y $5,5 \pm 0,1$ para el Producto Farmacológico de Referencia). Los valores se encuentran dentro de las especificaciones.

5.5.4 Contenido proteico mediante OD

Se encontró que la concentración de las formulaciones 1 y 2 (concentración objetivo = 20 mg/mL) estaba en el intervalo 18,0 – 19,0 mg/mL (dentro de límites de $\pm 10\%$ con respecto al objetivo) durante el estudio, sin tendencia alguna hacia la pérdida de proteína con el transcurso del tiempo.

15 La concentración de las formulaciones 3 y 4 y del producto farmacológico de referencia (concentración objetivo = 10 mg/mL) se encontró dentro del intervalo entre 9,5 – 10,0 mg/mL durante el estudio, sin tendencia alguna hacia la pérdida de proteína con el transcurso del tiempo. Los valores se encuentran dentro de las especificaciones.

El estrés térmico, en conclusión, no es perjudicial para el contenido proteico en las condiciones ensayadas (hasta 1 mes a 40°C).

20 5.5.5 Dímeros y HMW mediante SE-HPLC

No se resaltó cambio mayor alguno en la agregación después de 1 mes. Todos los valores estaban por debajo del 1% de agregados totales después de 1 mes (más bajo que los límites de las especificaciones, que no es más del 5%).

5.5.6 Fragmentos (LMW) mediante SDS-PAGE N-Red, Bioanalizador

25 Dada la variabilidad del método SDS-PAGE N-RED (por ejemplo, se determinaron valores en tiempo 0 de 11,9 y 14,5 para DP 01-190214 y DP 02-190214 respectivamente) se puede concluir que no se produce cambio importante alguno durante el estudio a 40 °C (Figura 23).

5.5.7 Partículas subvisibles

30 Como para las partículas subvisibles por cada envase, los conteos estaban abundantemente por debajo de los límites estipulados por la Farmacopea de los Estados Unidos, Europa y JP para soluciones para infusión o inyección con contenido nominal inferior a 100 mL (6000 por cada envase igual o superior a 10 μm y 600 por cada envase igual o superior a 25 μm). En las Figuras 24 y 25 se muestran los gráficos de barras relevantes.

No se resaltó cambio alguno en las partículas subvisibles luego del estrés térmico.

5.5.8 Actividad biológica

35 En general, los valores de bioactividad estaban dentro del intervalo entre 99 – 120 % para todos los puntos de tiempo ensayados en el transcurso del estudio de estabilidad. No se observó disminución alguna luego del estrés térmico en las muestras.

5.5.9 Patrón de isoformas

Los resultados de los experimentos iCE280 son reportados en la Figura 26 (agrupamiento ácido, suma de picos 1-2-3-4), Figura 27 (pico principal) y Figura 28 (agrupamiento básico, suma de picos 6-7).

40 El agrupamiento ácido tiende a aumentar en condiciones de almacenamiento a 40°C.

Las variaciones en el pico principal confirmaron una estabilidad ligeramente mejor de las nuevas formulaciones a 10 mg/mL y un comportamiento idéntico de las composiciones remanentes.

Los resultados obtenidos con la determinación de los agrupamientos ácidos confirmaron los resultados descritos anteriormente.

Hasta las dos semanas, se observó un comportamiento similar en las cinco composiciones. En tiempos de estabilidad más elevada, surge una leve diferenciación entre el Producto Farmacológico de Avelumab de 20 mg/mL y el de 10 mg/mL (resistencia ligeramente mejor en las formulaciones a 10 mg/mL).

5.5.10 Resultado de Estabilidad a 40°C

5 A 40°C (1 mes), las cinco formulaciones ensayadas no mostraron cambio alguno en términos de contenido proteico, apariencia, claridad, pH, agregados, partículas subvisibles y bioactividad con respecto a tiempo 0.

Se resaltaron pequeñas diferencias entre las formulaciones del Producto Farmacológico de 10 mg/mL y 20 mg/mL mediante iCE280 (el agrupamiento ácido tiende a sufrir cierto aumento tras el almacenamiento, ligeramente más evidente en las formulaciones de Producto Farmacológico de 20 mg/mL que en 10 mg/mL).

10 5.6 Conclusiones

5.6.1 Estabilidad a 2-8°C (12 meses)

15 Se encontró que todas las formulaciones eran estables: no se observó cambio significativo alguno en términos de apariencia, turbidez (mediante nefelometría), partículas subvisibles, pH, contenido proteico (mediante OD), agregación (mediante SE-HPLC), fragmentos (mediante SDS-PAGE N-RED y Bioanalizador), perfil de isoformas (mediante iCE280) y actividad biológica (mediante bioensayo) con respecto al tiempo 0.

5.6.2 Estabilidad a 25°C (6 meses)

Sin cambios en términos de contenido proteico, apariencia, claridad, pH, agregados, partículas subvisibles y bioactividad con respecto al tiempo 0.

20 Se descubrió que los fragmentos aumentan en +5% según SDS-PAGE N-RED después de seis meses a 25°C, mientras que no se resaltaron cambios estadísticamente significativos mediante Bioanalizador (un método usado como una herramienta adicional para agregar solidez a las conclusiones sobre la aparición de fragmentación).

Se observó un comportamiento similar en el perfil de isoformas mediante iCE280: el agrupamiento ácido de todas las formulaciones tiende a aumentar en +10% en el estudio de seis meses, con disminuciones concurrentes en el pico principal y en el agrupamiento básico.

25 5.6.3 Estabilidad a 40°C (1 mes)

Sin cambios en términos de contenido proteico, apariencia, claridad, pH, agregados, partículas subvisibles y bioactividad con respecto al tiempo 0.

30 Pequeñas diferencias entre las formulaciones de Productos Farmacológico de 10 mg/mL y 20 mg/mL resaltadas mediante iCE280 (el agrupamiento ácido tiende a sufrir cierto aumento luego del almacenamiento, ligeramente más evidente en formulaciones de Producto Farmacológico de 20 mg/mL que en las formulaciones de DP de 10 mg/mL)

5.7 Estabilidad en 24 meses

5.7.1 Fabricación de composiciones de DP

Se fabricaron las siguientes composiciones de DP y se estudió su estabilidad en el transcurso de un período de 24 meses:

Tabla 24: Composiciones de DP

Componente(s)	Composiciones DP	
	DP 01-160414	DP 02-160414
Avelumab	20 mg/mL	20 mg/mL
Ácido Acético Glacial (100%)	0.60 mg/mL *	0.60 mg/mL *
Manitol	51 mg/mL	51 mg/mL
Polisorbato 20	0,5 mg/mL	0,5 mg/mL
hidróxido sódico	0.30 mg/mL **	0.30 mg/mL **
Volumen de llenado	10 mL	30 mL
Potencia	200 mg/vial	600 mg/vial

<p>* Correspondiente a Acetato Sódico 10 mM</p>

<p>** pH final: 5,2</p>

5 Ambas formulaciones corresponden a la formulación DP 01-190214 como se muestra en la Tabla 22. La única diferencia es que se usó una cantidad fija de 0,3 mg/mL (7,5 mM) de hidróxido sódico para proporcionar un pH de 5,2 cuando se combina con 0,6 mg/mL de ácido acético glacial. La única diferencia entre las formulaciones DP 01-160414 y DP 02-160414 es que esta última formulación mencionada tiene un volumen de 30 mL por cada vial, mientras que la primera tiene 10 mL por cada vial.

Ambas formulaciones se filtraron dos veces a través de una membrana PVDF de 0,22 µm, seguido por el llenado manual en viales. Se analizó el contenido proteico antes y después de la filtración; los resultados relevantes indican que no se produce pérdida alguna de proteína tras la doble filtración aséptica

10 Se han recopilado los datos de estabilidad hasta 24 meses (a $+5 \pm 3$ °C) y hasta 6 meses a $+25^{\circ}\text{C} \pm 2$ °C (RH 60 % \pm 5 %) de las dos formulaciones en los respectivos envases finales (viales).

5.7.2 Estabilidad hasta 24 meses (a $+5 \pm 3$ °C)

15 A $+5 \pm 3^{\circ}\text{C}$, hasta 24 meses, no se observó cambio alguno en el contenido proteico (mediante OD), Pesos Moleculares Más Altos (HMW) (mediante SE-HPLC), turbidez (mediante nefelometría), formación de partículas (mediante oscurecimiento luminoso), grado de coloración (mediante inspección visual), y biopotencia. Leve aumento en las isoformas ácidas (+5 % observado para todas las composiciones después de 2 años).

No se observó cambio estadísticamente significativo alguno en términos de fragmentación mediante SDS-PAGE N-RED, Bioanalizador y CE-SDS N-RED.

5.7.3 Estabilidad hasta 6 meses a $+25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (RH 60% \pm 5%)

20 A $+25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (RH 60% \pm 5%), hasta 6 meses, no se observó cambio alguno en el contenido proteico (mediante OD), Pesos Moleculares Más Altos (HMW) (mediante SE-HPLC), turbidez (mediante nefelometría), formación de partículas (mediante oscurecimiento luminoso), perfil de isoformas (mediante iCE280), grado de coloración (mediante inspección visual), pureza electroforética (mediante SDS/-PAGE RED) y biopotencia. Similarmente a la estabilidad a 5 °C, no se observó aumento estadísticamente significativo alguno en la fragmentación a $+25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (RH 60% \pm 5%) (resultados confirmados por Bioanalizador (Bioanalyzer)).

5.7.4 Tiempo de Conservación

30 El tiempo de conservación antes de la filtración (en bolsas, hasta 24 horas a temperaturas del ambiente), tiempo de conservación después de filtración (en bolsas, hasta 72 horas a temperatura ambiente) y agitación (hasta 24 horas a 200 rpm a temperatura ambiente) no mostraron cambio significativo alguno en el contenido proteico, formación de partículas, agregados y turbidez, lo cual indica que no pueden surgir problemas importantes durante los tiempos convencionales de operaciones que son considerados generalmente durante el proceso de fabricación.

5.7.5 Estudio de Congelamiento / Descongelamiento

35 Un estudio de congelamiento / descongelamiento evidenció que las formulaciones ensayadas pueden ser congeladas en forma segura a -80°C y luego se pueden dejar calentar hasta $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$, o $+25^{\circ}\text{C}$, sin que se produzca cambio importante alguno en la proteína.

Lista de Secuencias

<110> Merck Patent GmbH
<120> FORMULACIÓN FARMACÉUTICA ACUOSA
5 <130> P 15/241
<160> 3
<170> BiSSAP 1.3.6
<210> 1
<211> 450
10 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Secuencia de cadena pesada de Avelumab
<400> 1
15

ES 2 823 279 T3

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

<210> 2

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Secuencia de cadena pesada de Avelumab, que carece el K C-terminal

<400> 2

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20						25				30		
Ile	Met	Met	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Ser	Ile	Tyr	Pro	Ser	Gly	Gly	Ile	Thr	Phe	Tyr	Ala	Asp	Thr	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Ile	Lys	Leu	Gly	Thr	Val	Thr	Thr	Val	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
		115					120					125			
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
	130					135					140				
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
145					150					155					160
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
				165					170					175	
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
			180					185					190		
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
	195						200					205			
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	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
		355					360					365			
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
	370					375					380				
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
385					390					395					400
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
				405					410					415	
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
			420					425					430		
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
		435					440					445			

Gly

<210> 3

<211> 216

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de cadena ligera de Avelumab

<400> 3

Gln	Ser	Ala	Leu	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Val	Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln
1				5					10					15	
Ser	Ile	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Gly	Tyr
			20					25					30		
Asn	Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu
		35					40					45			
Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Ser	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Ser	Asn	Arg	Phe
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu
65					70					75					80
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Ser	Tyr	Thr	Ser	Ser
				85					90					95	
Ser	Thr	Arg	Val	Phe	Gly	Thr	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Gln
			100						105					110	
Pro	Lys	Ala	Asn	Pro	Thr	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Glu
		115						120					125		
Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr
	130						135					140			
Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Gly	Ser	Pro	Val	Lys
145					150					155					160
Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Lys	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr
				165					170					175	
Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	His
			180						185				190		
Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Lys
		195					200						205		
Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser								
	210					215									

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de anticuerpo farmacéutica acuosa, que comprende:
- (i) Avelumab en una concentración de 1 mg/mL a 30 mg/mL como el anticuerpo;
- 5 (ii) acetato o histidina en una concentración de 5 mM a 15 mM como el agente tamponante;
- (iii) D-manitol o trehalosa en una concentración de 240 mM a 320 mM, o una combinación de arginina HCl en una concentración de 50 a 150 mM y ácido glutámico en una concentración de 25 mM a 75 mM como un estabilizante;
- (iv) Poloxámero 188 o Polisorbato 20 en una concentración de 0,25 mg/mL a 0,75 mg/mL, como tensioactivo, o sin tensioactivo;
- 10 donde la formulación no comprende un antioxidante, y
- donde adicionalmente la formulación tiene un pH de 5,0 a 6,0.
2. La formulación según la reivindicación 1, en la que el pH es 5,0 a 5,6.
3. La formulación según la reivindicación 1 o 2, en la que la concentración de Avelumab es aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 20 mg/mL.
- 15 4. La formulación según la reivindicación 1-3, en la que la concentración de acetato o histidina es de aproximadamente 10 mM.
5. La formulación según la reivindicación 1-3, en la que la concentración de dicho D-manitol o trehalosa es de aproximadamente 280 mM, o para dicha combinación de arginina HCl y ácido glutámico, la concentración de arginina HCl es de aproximadamente 150 mM y la concentración de ácido glutámico es de aproximadamente 50 mM.
- 20 6. La formulación según la reivindicación 1-3, en la que la concentración de dicho poloxámero 188 o polisorbato 20 es de aproximadamente 0,5 mg/mL.
7. La formulación según las reivindicaciones 1-3, en la que dicho pH es 5,2 ($\pm 0,1$) a 5,5 ($\pm 0,1$).
8. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende acetato en una concentración de aproximadamente 10 mM, y no comprende ningún otro agente tamponante.
- 25 9. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende D-manitol o trehalosa en una concentración de aproximadamente 280 mM, y que no comprende ningún otro estabilizante.
10. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende polisorbato 20 o poloxámero 188 en una concentración de aproximadamente 0,5 mg/mL, y que no comprende ningún otro tensioactivo.
11. Una formulación de anticuerpo farmacéutica acuosa, que comprende:
- 30 (i) Avelumab en una concentración de aproximadamente 10 mg/mL como el anticuerpo;
- (ii) acetato en una concentración de aproximadamente 10 mM como el agente tamponante;
- (iii) D-manitol o trehalosa en una concentración de aproximadamente 280 mM como un estabilizante;
- (iv) Polisorbato 20 o Poloxámero 188 en una concentración de aproximadamente 0,5 mg/mL como tensioactivo;
- donde la formulación no comprende un antioxidante, y
- 35 donde adicionalmente la formulación tiene un pH de 5,5 ($\pm 0,1$).
12. La formulación según la reivindicación 9, que comprende:
- (i) Avelumab en una concentración de 10 mg/mL;
- (ii) acetato en una concentración de 10 mM;
- (iii) D-manitol o trehalosa en una concentración de 280 mM;
- 40 (iv) Polisorbato 20 o Poloxámero 188 en una concentración de 0,5 mg/mL;
- donde la formulación tiene un pH de 5,5 ($\pm 0,1$).

13. La formulación según la reivindicación 10, que consiste en:

- (i) Avelumab en una concentración de 10 mg/mL;
 - (ii) acetato sódico trihidratado en una concentración de 10 mM;
 - (iii) D-manitol o trehalosa en una concentración de 280 mM;
 - 5 (iv) Polisorbato 20 o Poloxámero 188 en una concentración de 0,5 mg/mL;
 - (v) HCl para ajustar el pH;
 - (vi) agua (para inyección) como el disolvente;
- donde la formulación tiene un pH de 5,5 (\pm 0,1).

14. La formulación según la reivindicación 13, que consiste en:

- 10 (i) Avelumab en una concentración de 10 mg/mL;
 - (ii) acetato sódico trihidratado en una concentración de 10 mM;
 - (iii) trehalosa dihidratada en una concentración de 280 mM;
 - (iv) Polisorbato 20 en una concentración de 0,5 mg/mL;
 - (v) HCl para ajustar el pH;
 - 15 (vi) agua (para inyección) como el diluyente;
- donde la formulación tiene un pH de 5,5 (\pm 0,1).

15. La formulación según la reivindicación 11, que consiste en:

- (i) Avelumab en una concentración de 10 mg/mL;
 - (ii) acetato sódico trihidratado en una concentración de 10 mM;
 - 20 (iii) D-manitol en una concentración de 280 mM;
 - (iv) Polisorbato 20 en una concentración de 0,5 mg/mL;
 - (v) HCl para ajustar el pH;
 - (vi) agua (para inyección) como el diluyente;
- donde la formulación tiene un pH de 5,5 (\pm 0,1).

25 16. La formulación según la reivindicación 1, que comprende:

- (i) Avelumab en una concentración de aproximadamente 20 mg/mL como el anticuerpo;
 - (ii) acetato en una concentración de aproximadamente 10 mM como el agente tamponante;
 - (iii) D-manitol o trehalosa en una concentración de aproximadamente 280 mM como un estabilizante;
 - (iv) Polisorbato 20 o Poloxámero 188 en una concentración de aproximadamente 0,5 mg/mL como tensioactivo;
- 30 donde la formulación tiene un pH de 5,2 (\pm 0,1).

17. La formulación según la reivindicación 16, que comprende:

- (i) Avelumab en una concentración de 20 mg/mL;
 - (ii) acetato en una concentración de 10 mM;
 - (iii) D-manitol o trehalosa en una concentración de 280 mM;
 - 35 (iv) Polisorbato 20 o Poloxámero 188 en una concentración de 0,5 mg/mL;
- donde la formulación tiene un pH de 5,5 (\pm 0,1).

18. La formulación según la reivindicación 16, que consiste en:

- (i) Avelumab en una concentración de 20 mg/mL;
 - (ii) ácido acético en una concentración de 10 mM;
 - (iii) D-manitol o trehalosa dihidratada en una concentración de 280 mM;
 - (iv) Polisorbato 20 o Poloxámero 188 en una concentración de 0,5 mg/mL;
- 5 (v) acetato sódico para ajustar el pH;
- (vi) agua (para inyección) como el diluyente;
- donde la formulación tiene un pH de 5,2 (\pm 0,1).

19. La formulación según la reivindicación 18, que consiste en:

- (i) Avelumab en una concentración de 20 mg/mL;
- 10 (ii) ácido acético en una concentración de 10 mM;
- (iii) D-manitol en una concentración de 280 mM;
 - (iv) Polisorbato 20 en una concentración de 0,5 mg/mL;
 - (v) acetato sódico para ajustar el pH;
 - (vi) agua (para inyección) como el diluyente;
- 15 donde la formulación tiene un pH de 5,2 (\pm 0,1).

20. La formulación según la reivindicación 18, que consiste en:

- (i) Avelumab en una concentración de 20 mg/mL;
 - (ii) ácido acético en una concentración de 10 mM;
 - (iii) trehalosa dihidratada en una concentración de 280 mM;
- 20 (iv) Polisorbato 20 en una concentración de 0,5 mg/mL;
- (v) acetato sódico para ajustar el pH;
 - (vi) agua (para inyección) como el diluyente;
- donde la formulación tiene un pH de 5,2 (\pm 0,1).

21. La formulación según la reivindicación 18, que consiste en:

- (i) Avelumab en una concentración de 20 mg/mL;
 - (ii) ácido acético en una concentración de 10 mM;
 - (iii) D-manitol en una concentración de 280 mM;
 - (iv) Poloxámero 188 en una concentración de 0,5 mg/mL;
 - (v) acetato sódico para ajustar el pH;
- 25 (vi) agua (para inyección) como el diluyente;
- 30 donde la formulación tiene un pH de 5,2 (\pm 0,1).

22. La formulación según la reivindicación 18, que consiste en:

- (i) Avelumab en una concentración de 20 mg/mL;
 - (ii) ácido acético en una concentración de 10 mM;
- 35 (iii) trehalosa dihidratada en una concentración de 280 mM;
- (iv) Poloxámero 188 en una concentración de 0,5 mg/mL;
 - (v) acetato sódico para ajustar el pH;

- (vi) agua (para inyección) como el diluyente;
 donde la formulación tiene un pH de 5,2 (\pm 0,1).
23. La formulación según la reivindicación 16, que consiste en:
- (i) Avelumab en una concentración de 20 mg/mL;
- 5 (ii) ácido acético en una concentración de 10 mM;
- (iii) D-manitol en una concentración de 280 mM;
- (iv) Polisorbato 20 en una concentración de 0,5 mg/mL;
- (v) hidróxido sódico en una concentración de 7,5 mM;
- (vi) agua (para inyección) como el diluyente;
- 10 donde la formulación tiene un pH de 5,2 (\pm 0,1).
24. La formulación según la reivindicación 23, donde la formulación se prepara combinando:
- (i) 20 mg/mL de Avelumab;
- (ii) 0,6 mg/mL de ácido acético glacial;
- (iii) 51 mg/mL de D-manitol;
- 15 (iv) 0,5 mg/mL de Polisorbato 20;
- (v) 0,3 mg/mL de hidróxido sódico;
- (vi) agua (para inyección) como el diluyente.
25. La formulación según la reivindicación 2, que consiste en:
- (i) Avelumab en una concentración de 20 mg/mL;
- 20 (ii) ácido acético en una concentración de 0,6 mg/mL;
- (iii) D-manitol en una concentración de 51 mg/mL;
- (iv) Polisorbato 20 en una concentración de 0,5 mg/mL;
- (v) hidróxido sódico en una concentración de 0,3 mg/mL;
- (vi) agua (para inyección) como el diluyente;
- 25 donde la formulación tiene un pH de 5,0 a 5,6.
26. Una formulación de anticuerpo farmacéutico acuosa, que consiste en Avelumab en una concentración de 20 mg/mL como el principio activo; y ácido acético glacial, D-manitol, Polisorbato 20, hidróxido sódico y agua para inyección como los excipientes; donde la formulación tiene un pH de 5,0 a 5,6.
27. La formulación según la reivindicación 26 que tiene un pH de 5,2 (\pm 0,1).
- 30 28. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1-27, en la que el Avelumab tiene la secuencia de cadena pesada ya sea de (SEQ ID NO:1) o (SEQ ID NO:2), la secuencia de cadena ligera de (SEQ ID NO:3), y porta una glicosilación en Asn300 que comprende FA2 y FA2G1 como las especies de glicanos principales, que tienen una parte en conjunto de > 70% de todas las especies de glicanos.
- 35 29. La formulación según la reivindicación 28, en la que en la glicosilación de Avelumab dicho FA2 tiene una parte del 44% - 54% y dicho FA2G1 tiene una parte del 25% - 41% de todas las especies de glicanos.
30. La formulación según la reivindicación 29, en la que en la glicosilación de Avelumab dicho FA2 tiene una parte del 47% - 52% y dicho FA2G1 tiene una parte del 29% - 37% de todas las especies de glicanos.
- 40 31. La formulación según la reivindicación 28, en la que en la glicosilación de Avelumab dicho FA2 tiene una parte de aproximadamente el 49% y dicho FA2G1 tiene una parte de aproximadamente el 30% - aproximadamente el 35% de todas las especies de glicanos.

32. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 28-31, en la que la glicosilación de Avelumab comprende además como especie de glicano menor A2 con una parte de < 5%, A2G1 con una parte de < 5%, A2G2 con una parte de < 5% y FA2G2 con una parte de < 7% de todas las especies de glicanos.
- 5 33. La formulación según la reivindicación 32, en la que en la glicosilación de Avelumab dicho A2 tiene una parte del 3%-5%, dicho A2G1 tiene una parte de < 4%, dicho A2G2 tiene una parte de < 3% y dicho FA2G2 tiene una parte del 5%-6% de todas las especies de glicanos.
- 10 34. La formulación según la reivindicación 33, en la que en la glicosilación de Avelumab dicho A2 tiene una parte de aproximadamente el 3,5% - aproximadamente el 4,5%, dicho A2G1 tiene una parte de aproximadamente el 0,5% - aproximadamente el 3,5%, dicho A2G2 tiene una parte de < 2,5% y dicho FA2G2 tiene una parte de aproximadamente el 5,5% de todas las especies de glicanos.
35. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 28-34, en la que dicho Avelumab tiene la secuencia de cadena pesada de (SEQ ID NO:2).
36. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-35, que es para administración intravenosa (IV).
37. Un vial que contiene la formulación según la reivindicación 36.
- 15 38. El vial según la reivindicación 37, que contiene 200 mg de Avelumab en 10 mL de disolución para una concentración de 20 mg/mL.
39. El vial según las reivindicaciones 37 o 38, que es un vial de vidrio.
40. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-36 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 20 41. La formulación para su uso según la reivindicación 40, en la que el cáncer se selecciona de cáncer pulmonar de células no pequeñas, carcinoma urotelial, cáncer de vejiga, mesotelioma, carcinoma de células de Merkel, cáncer gástrico o de la unión gastroesofágica, cáncer de ovario, cáncer de mama, timoma, adenocarcinoma estomacal, carcinoma adrenocortical, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma de células renales, melanoma, y/o linfoma de Hodgkin clásico.

Fig. 1a

Secuencia de cadena pesada de Avelumab SEQ ID NO:1

EVQLLES GGGLVQP GGSLRLS CAASGFT FSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSG
GITFYADTVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

Fig. 1b

Secuencia de cadena pesada de Avelumab, que carece el K C-terminal - SEQ ID NO:2

EVQLLES GGGLVQP GGSLRLS CAASGFT FSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSG
GITFYADTVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPG

Fig. 2

Secuencia de cadena ligera de Avelumab - SEQ ID NO:3

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSN
RPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYCYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVLG
QPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTK
PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Fig. 3

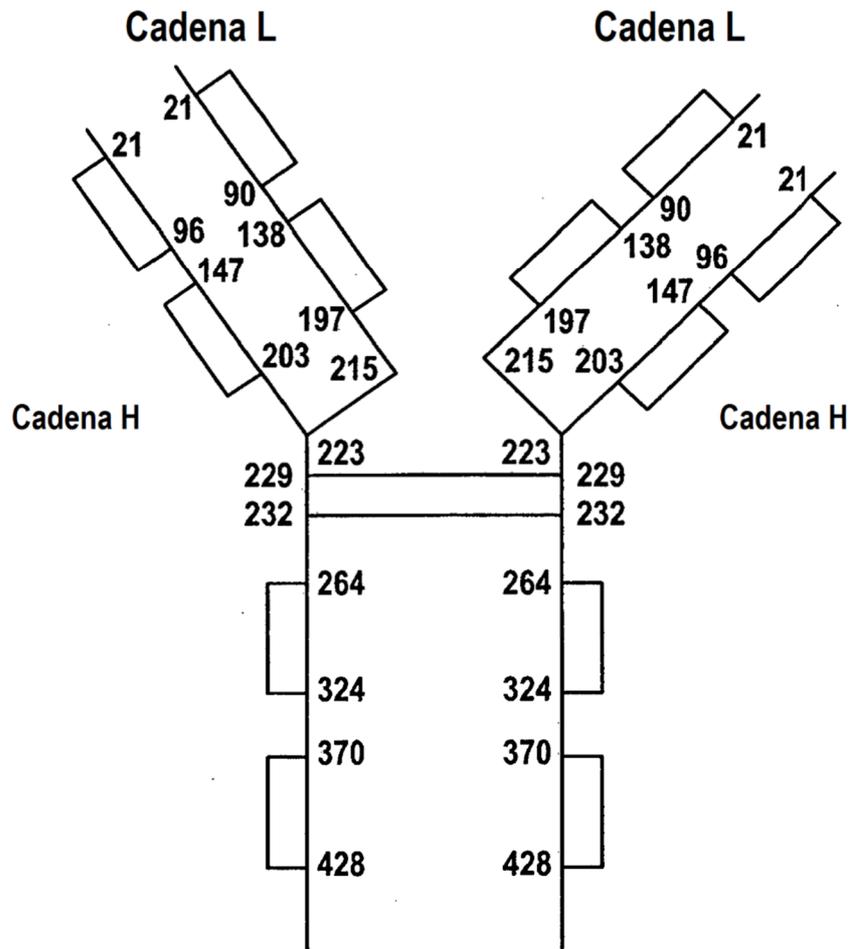


Fig. 4

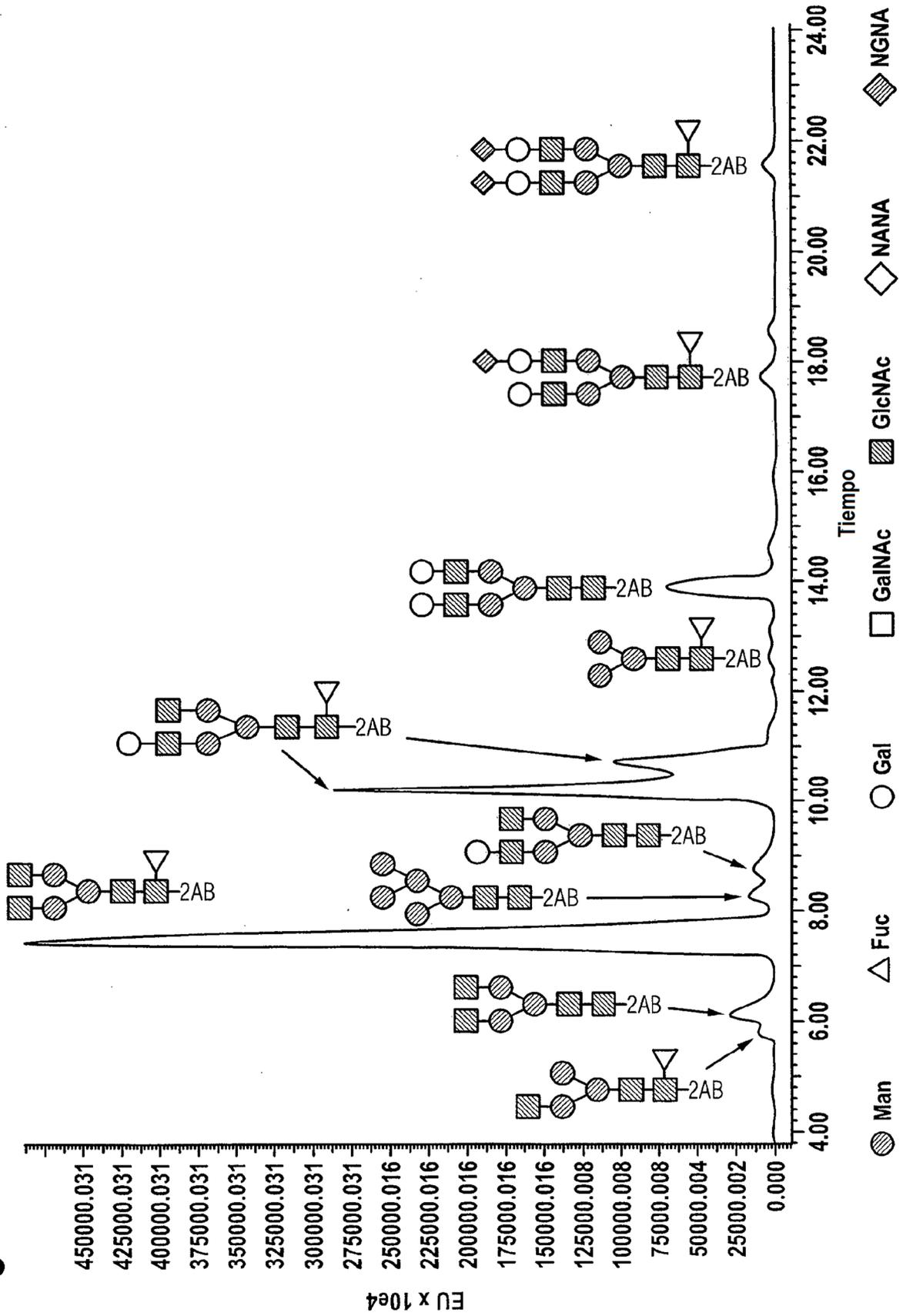


Fig. 5

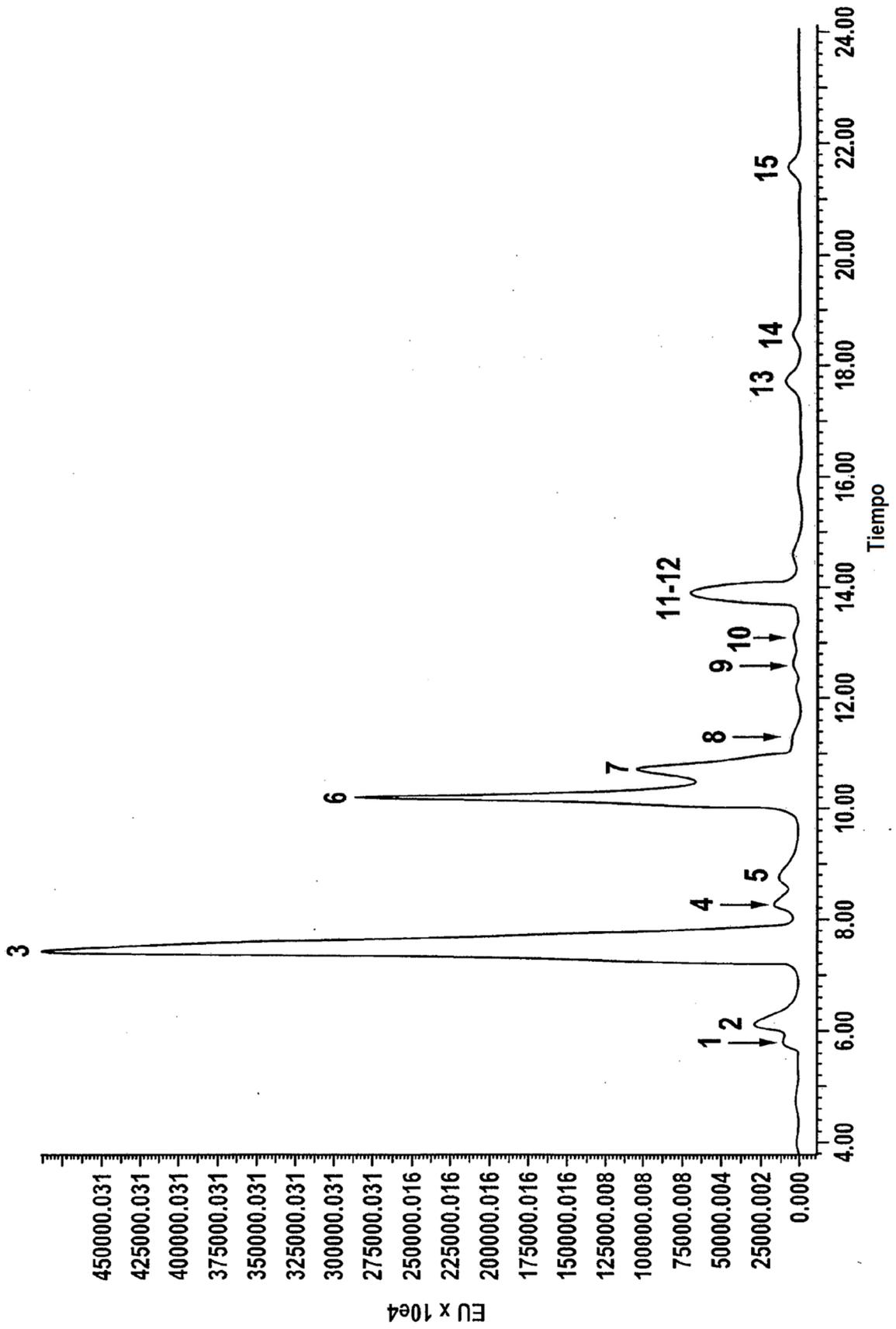


Fig. 6

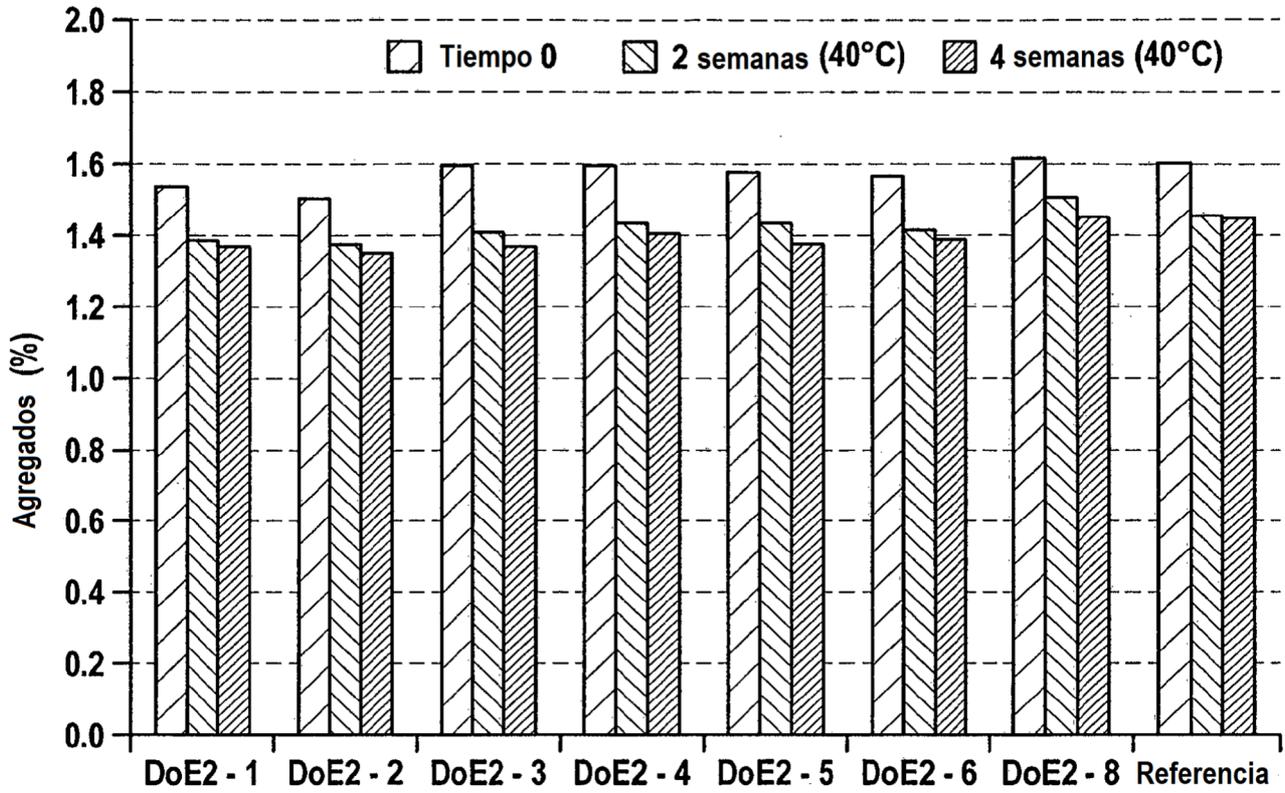


Fig. 7

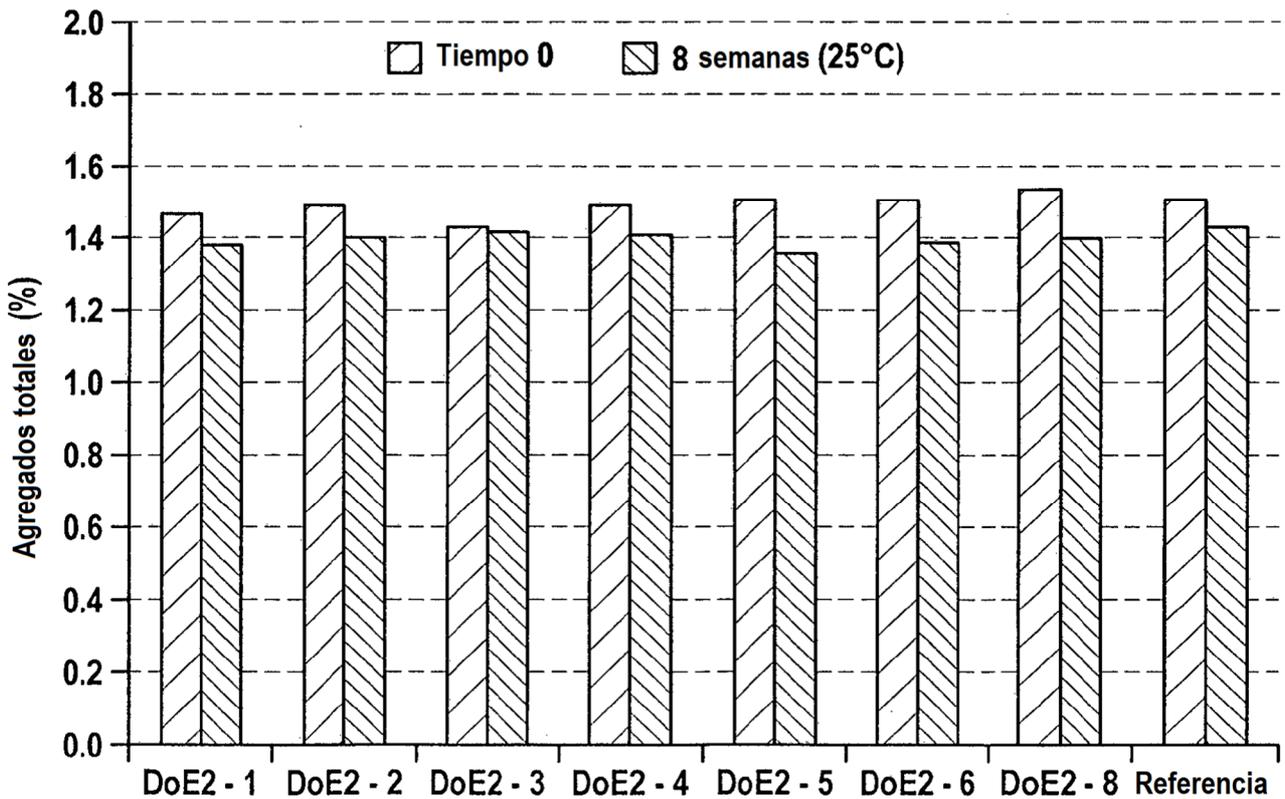


Fig. 8

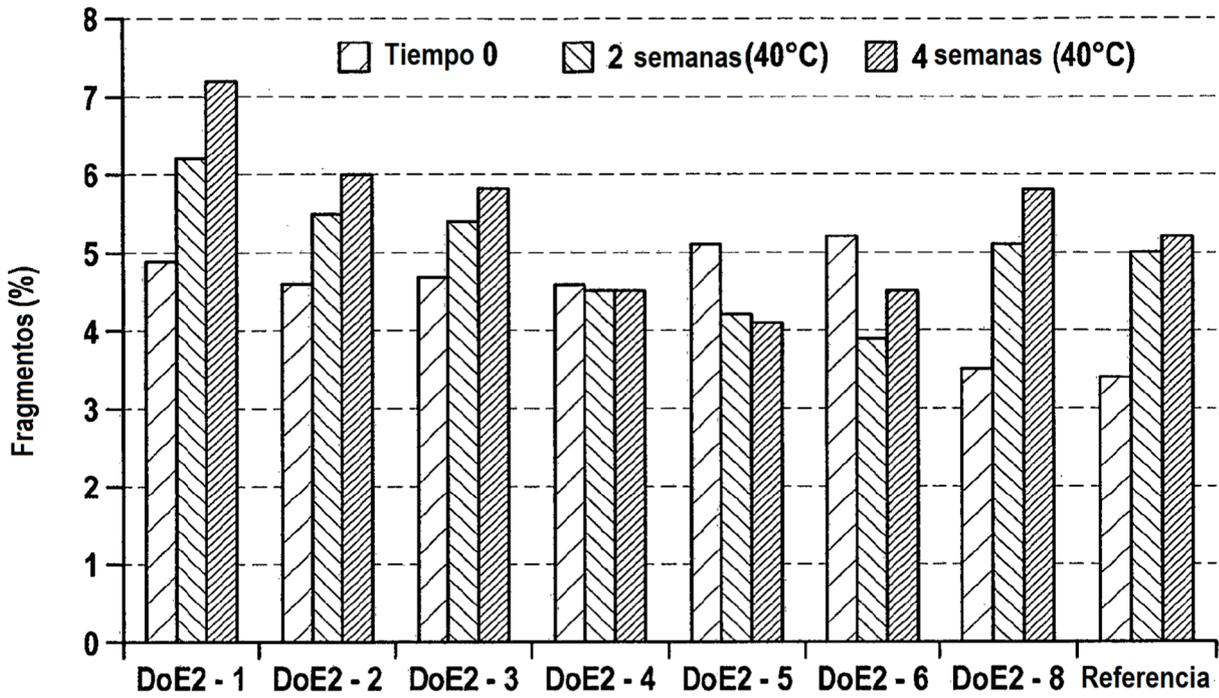


Fig. 9

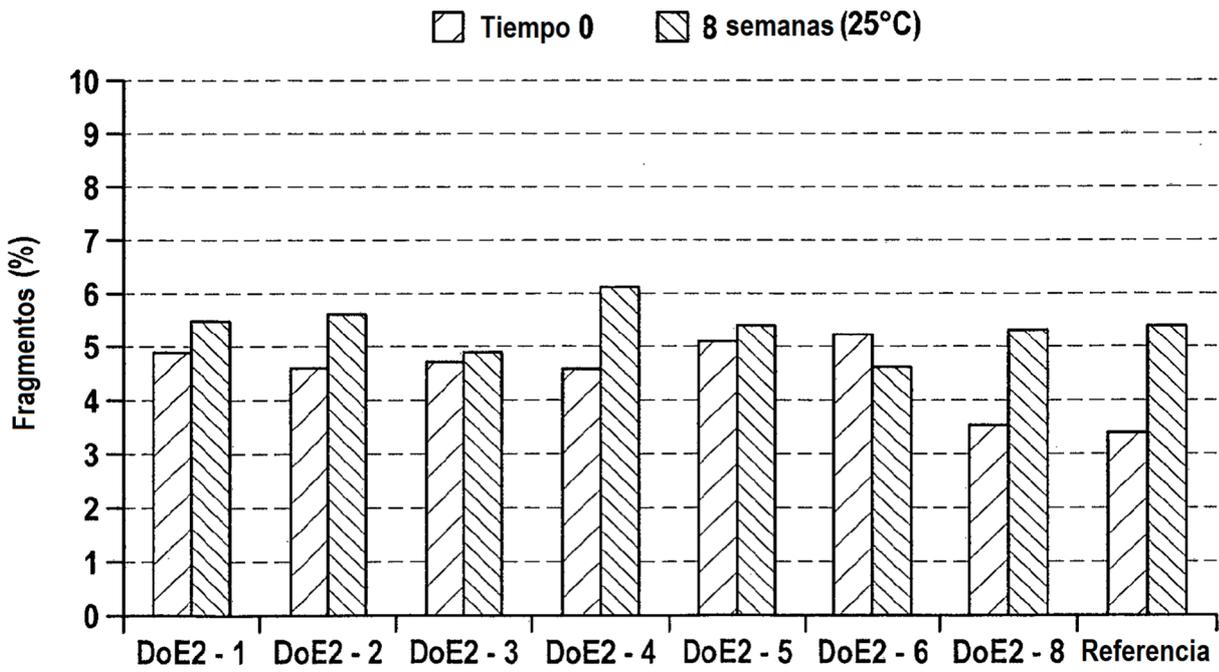


Fig. 10

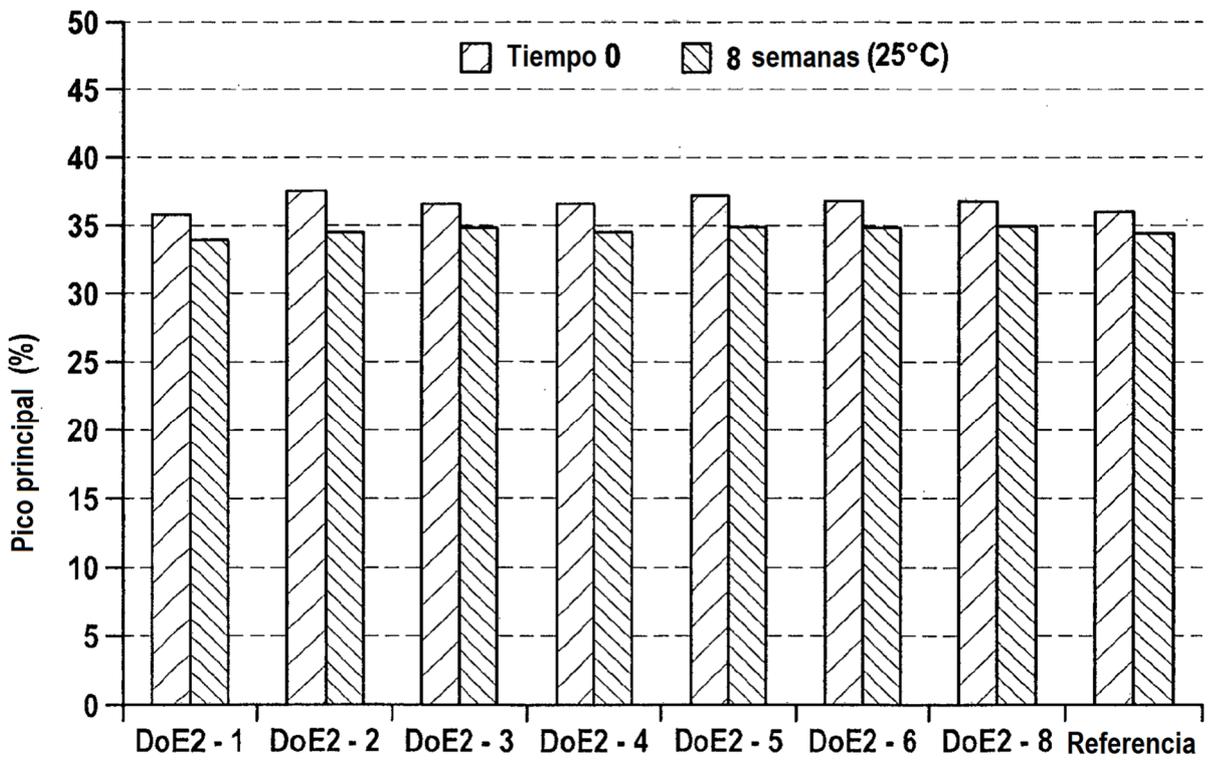
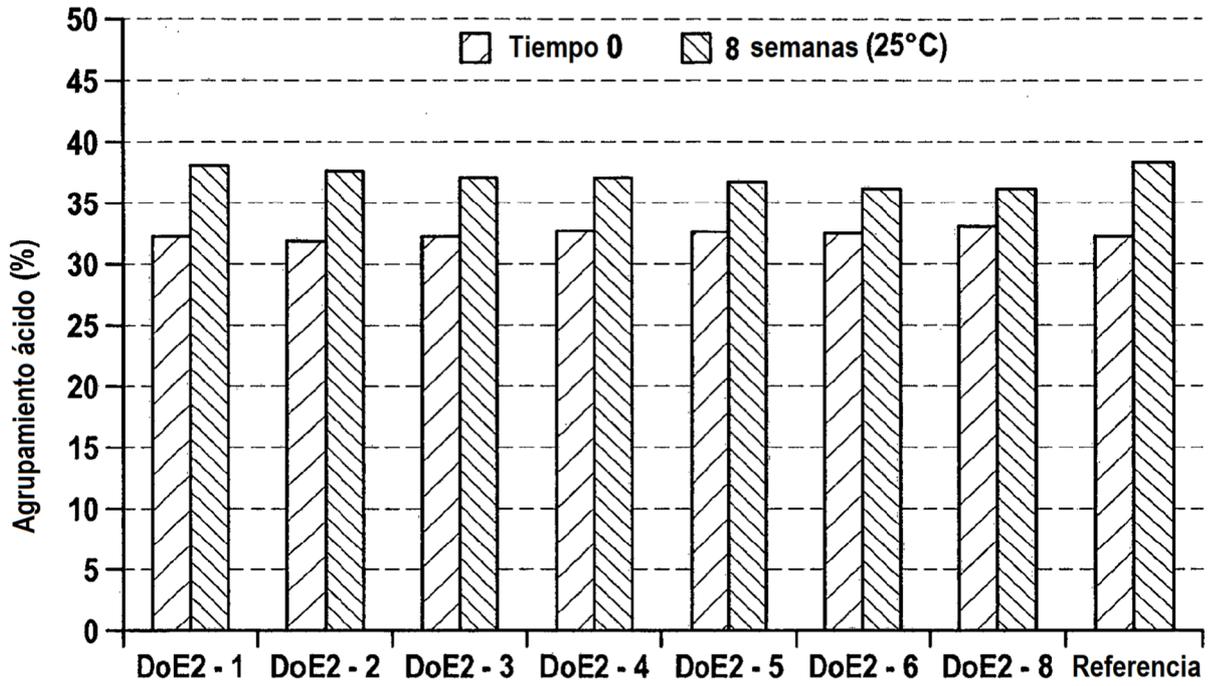


Fig. 11

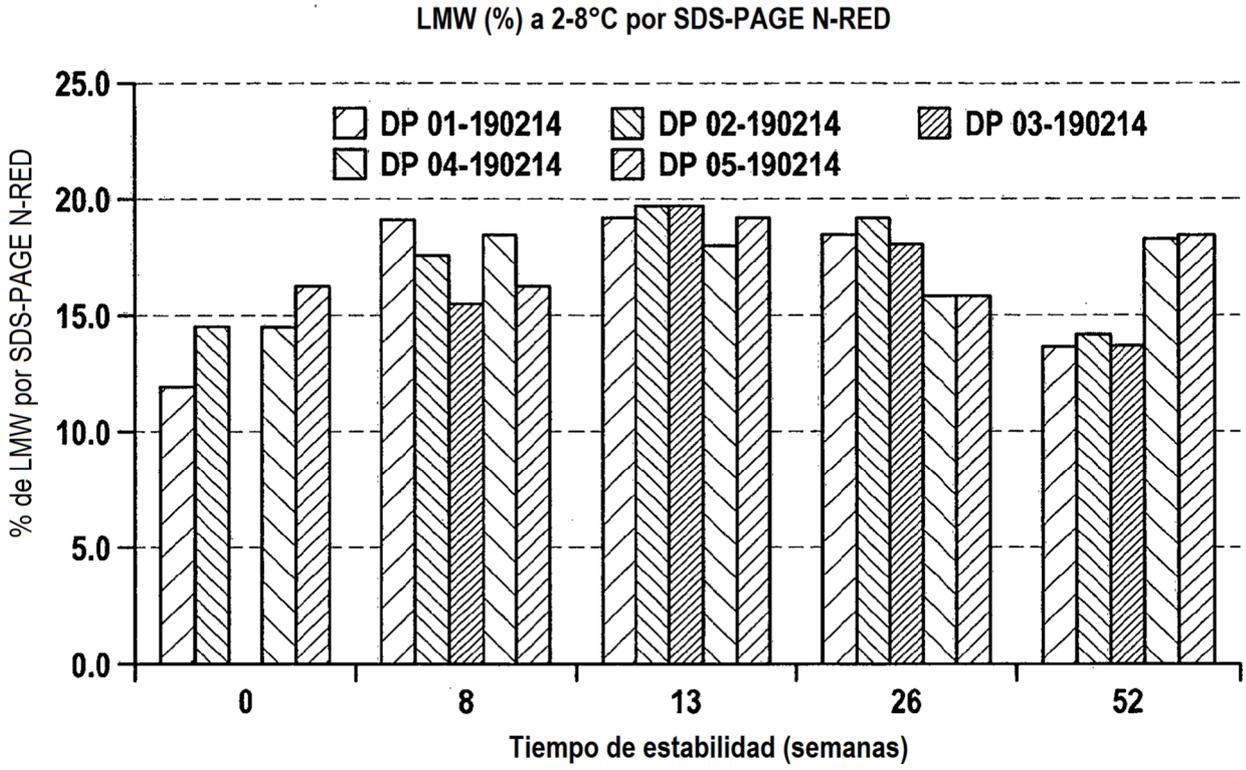


Fig. 12

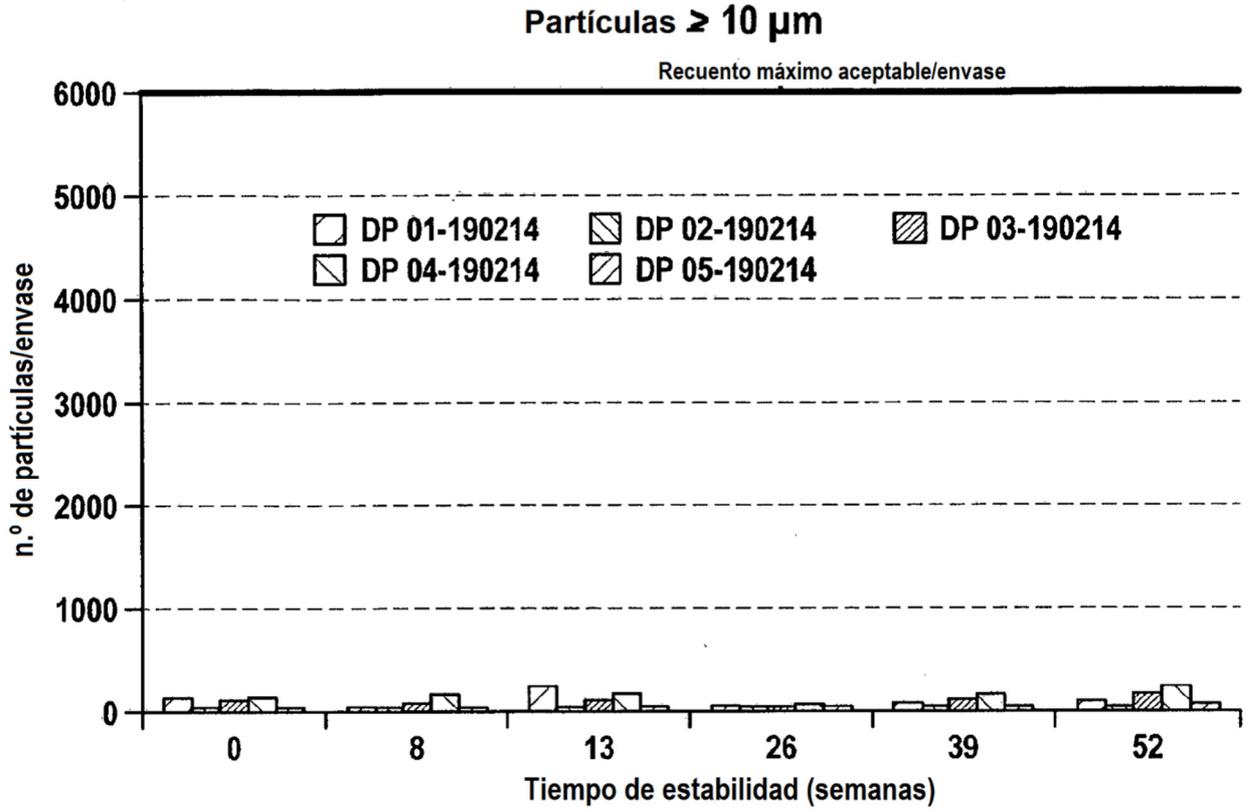


Fig. 13

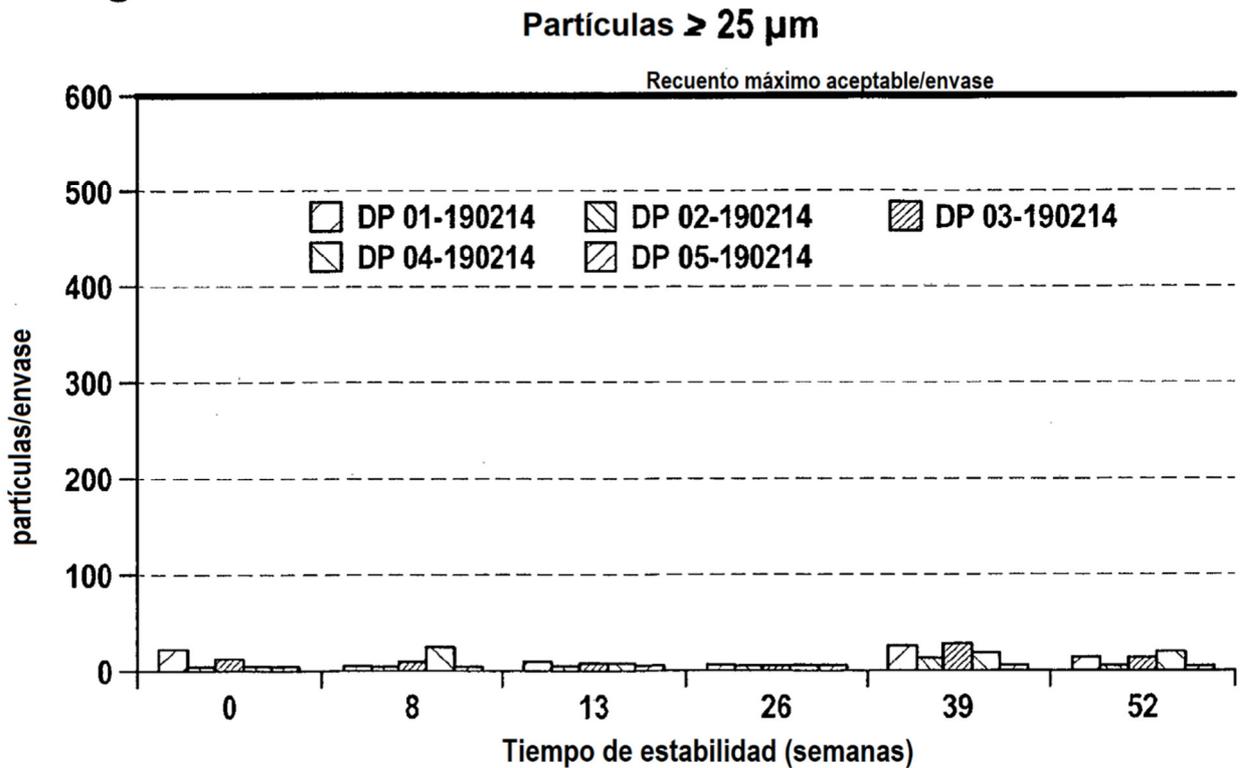


Fig. 14

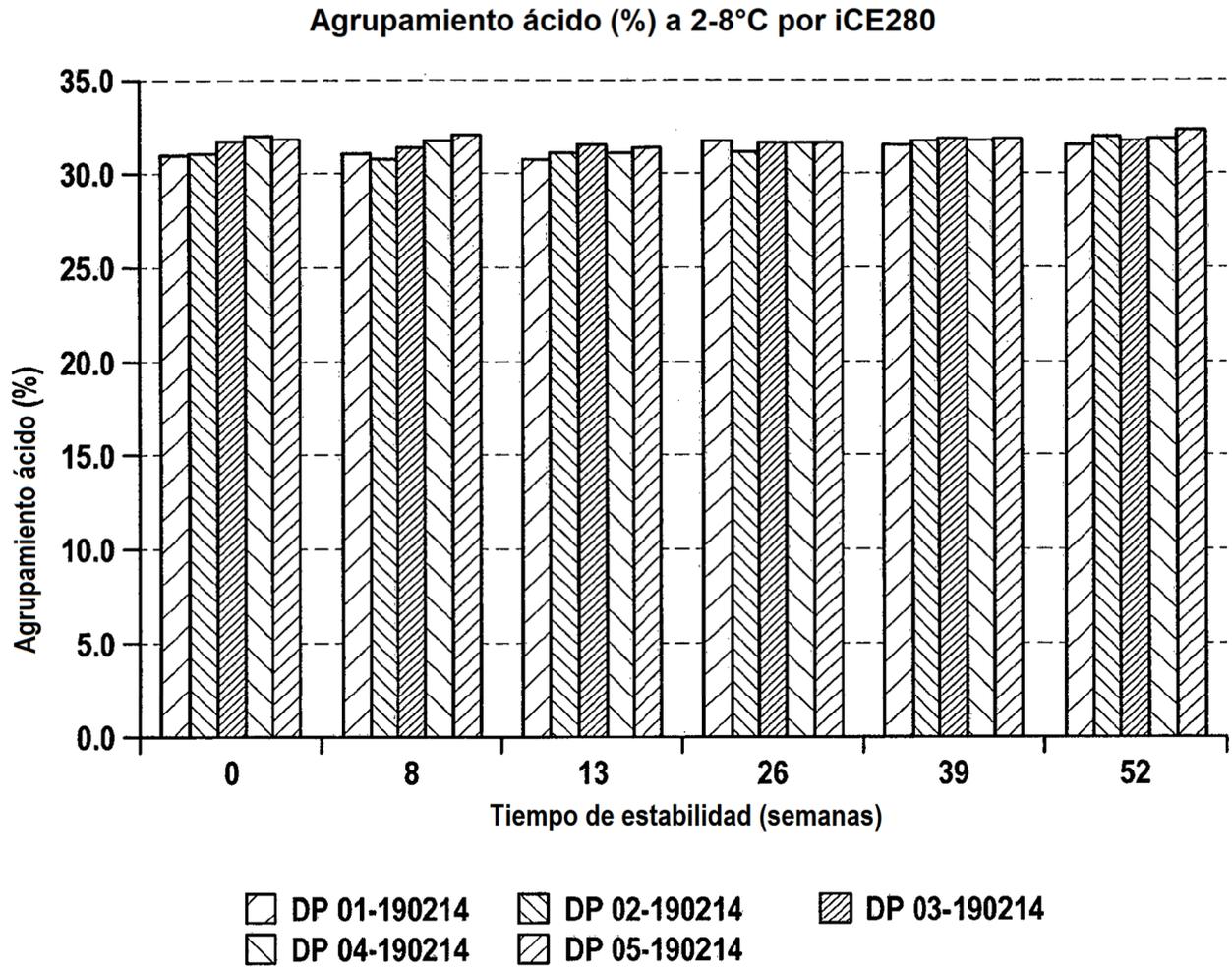


Fig. 15

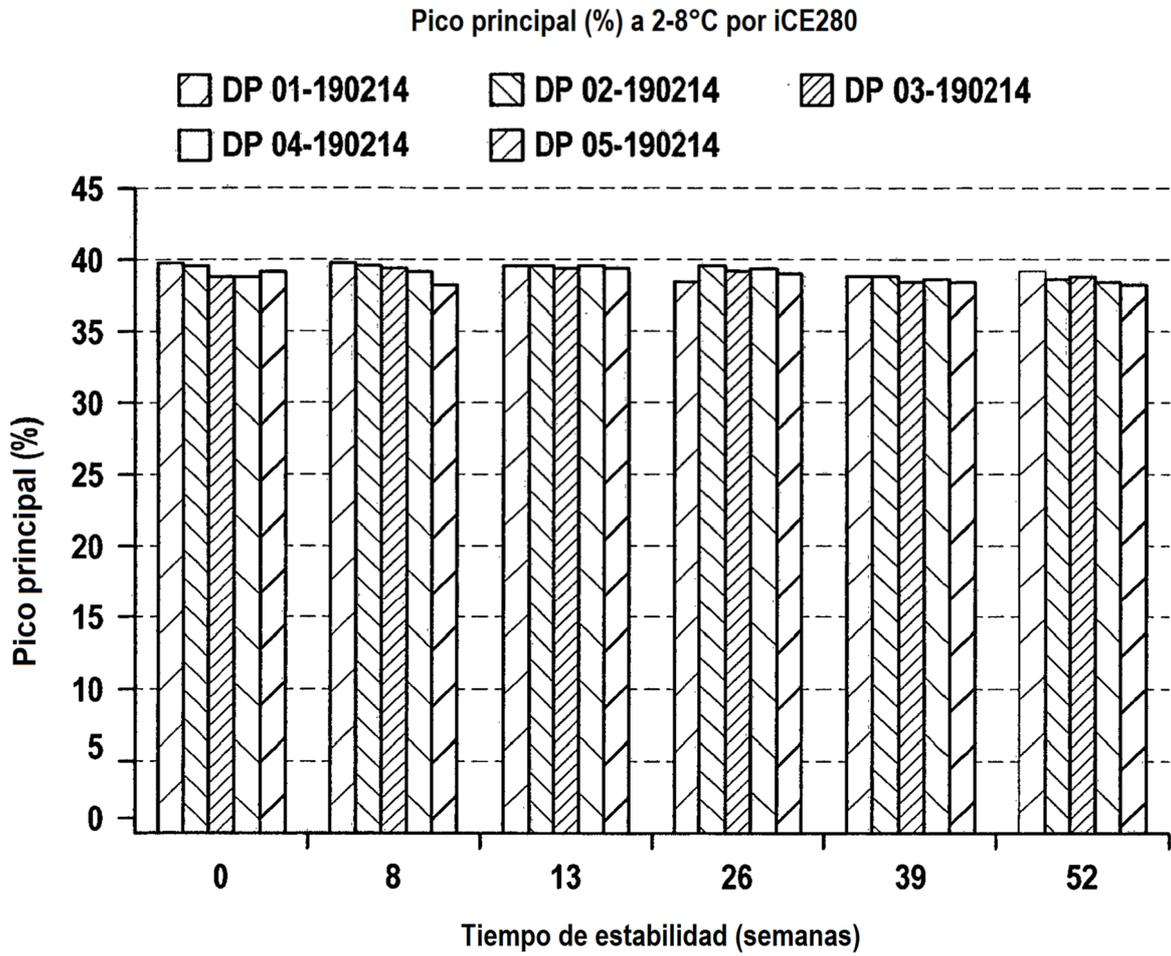


Fig. 16

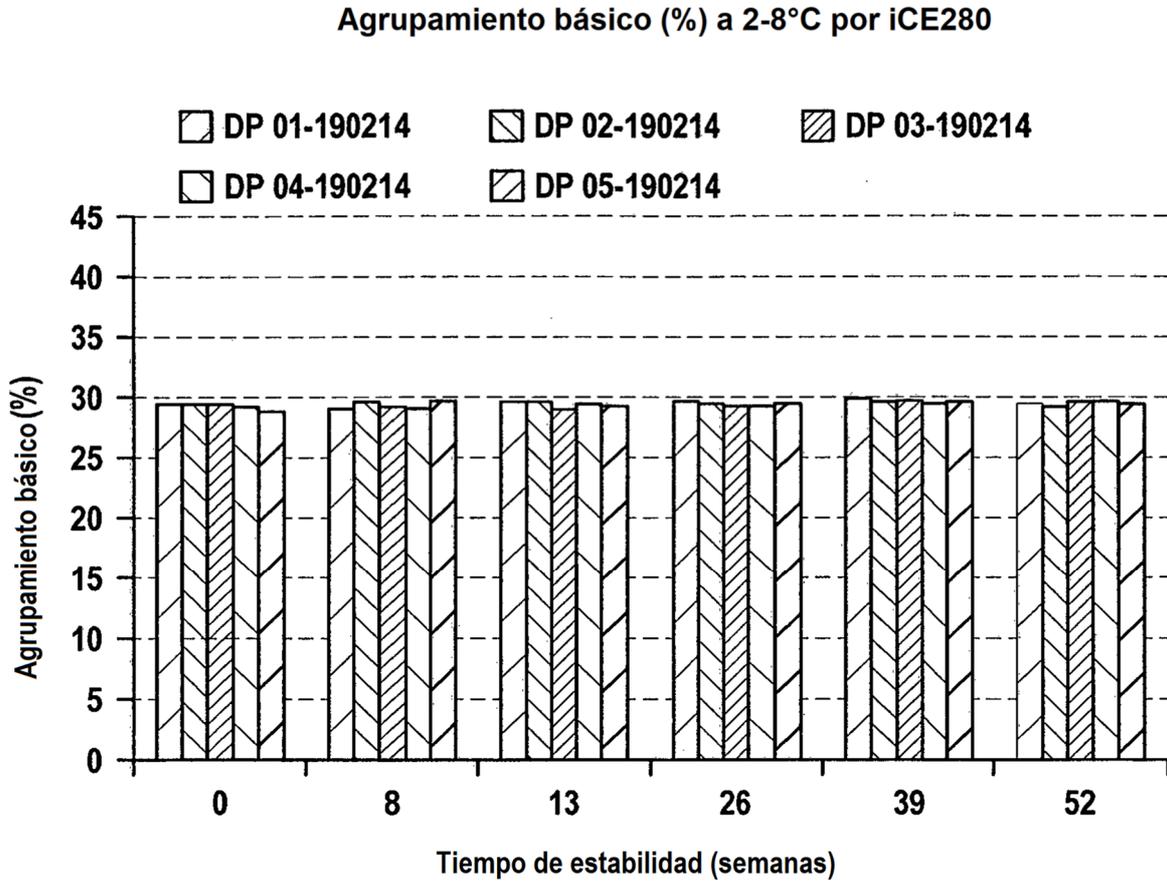


Fig. 17

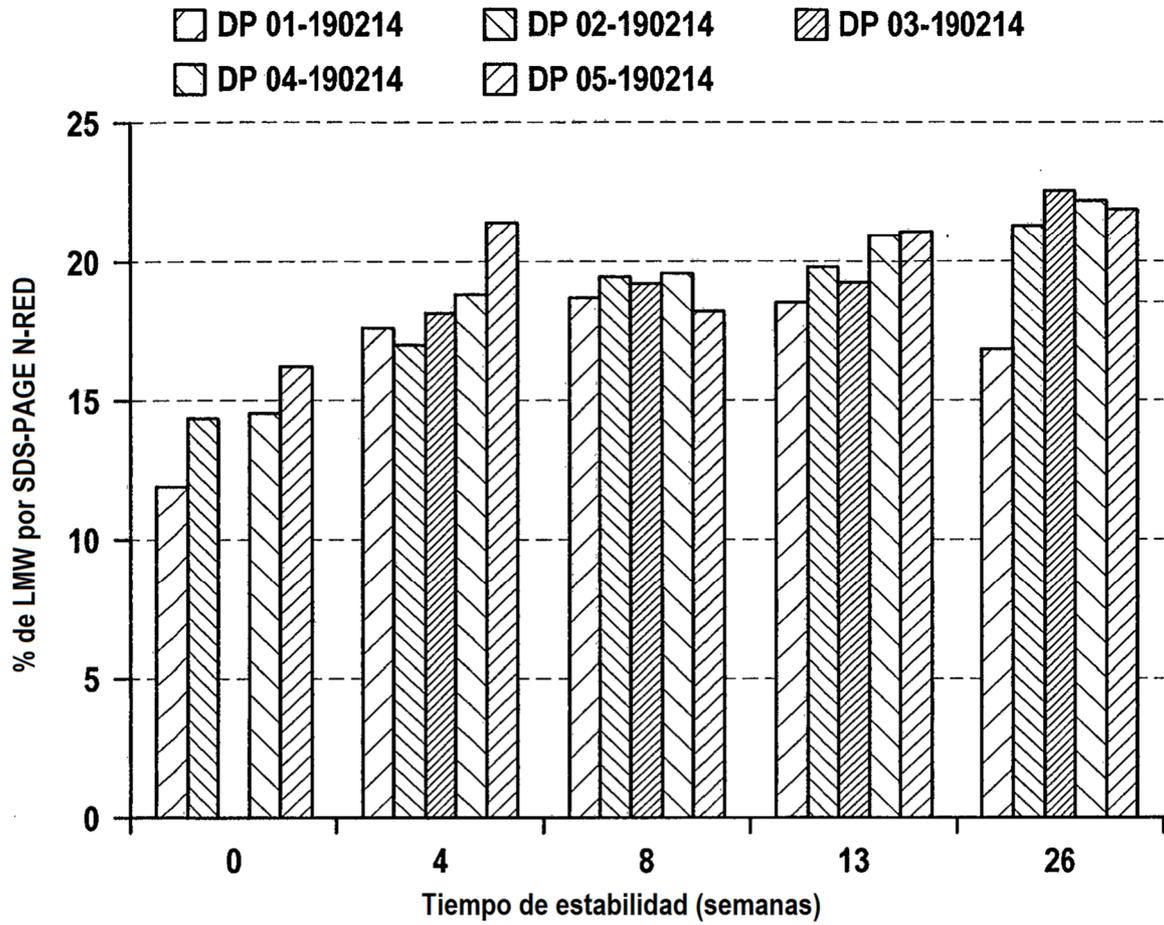


Fig. 18

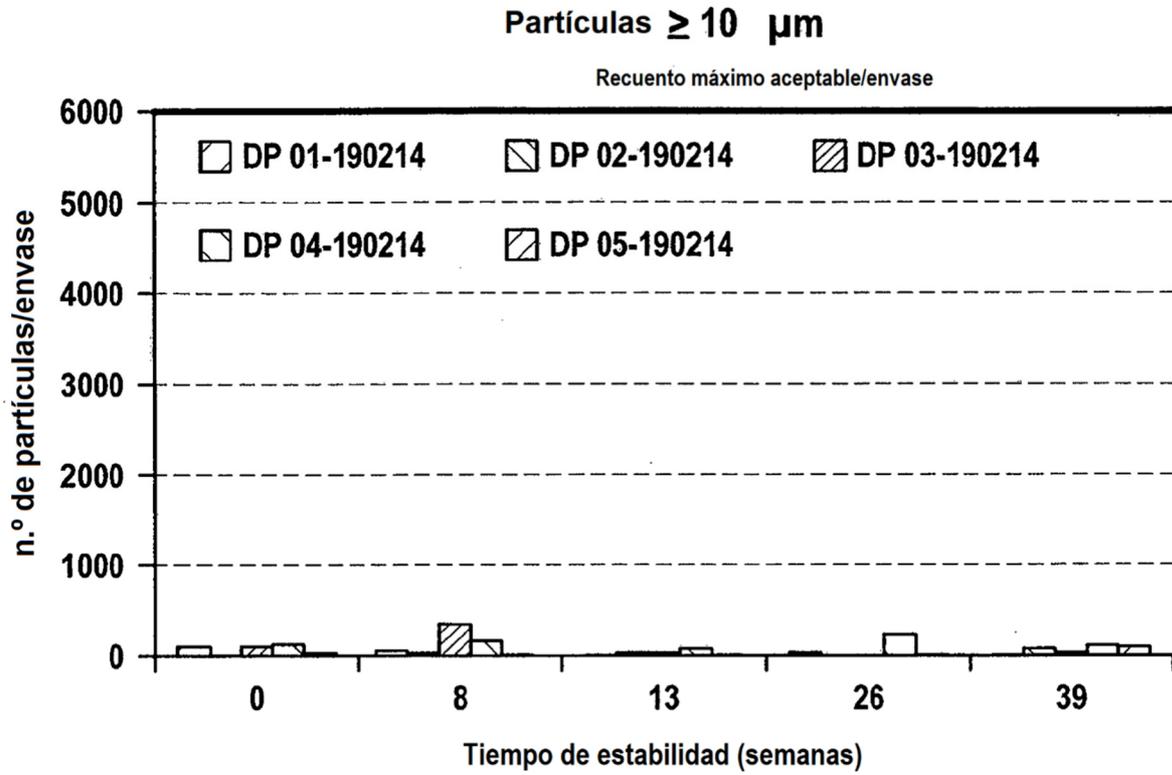


Fig. 19

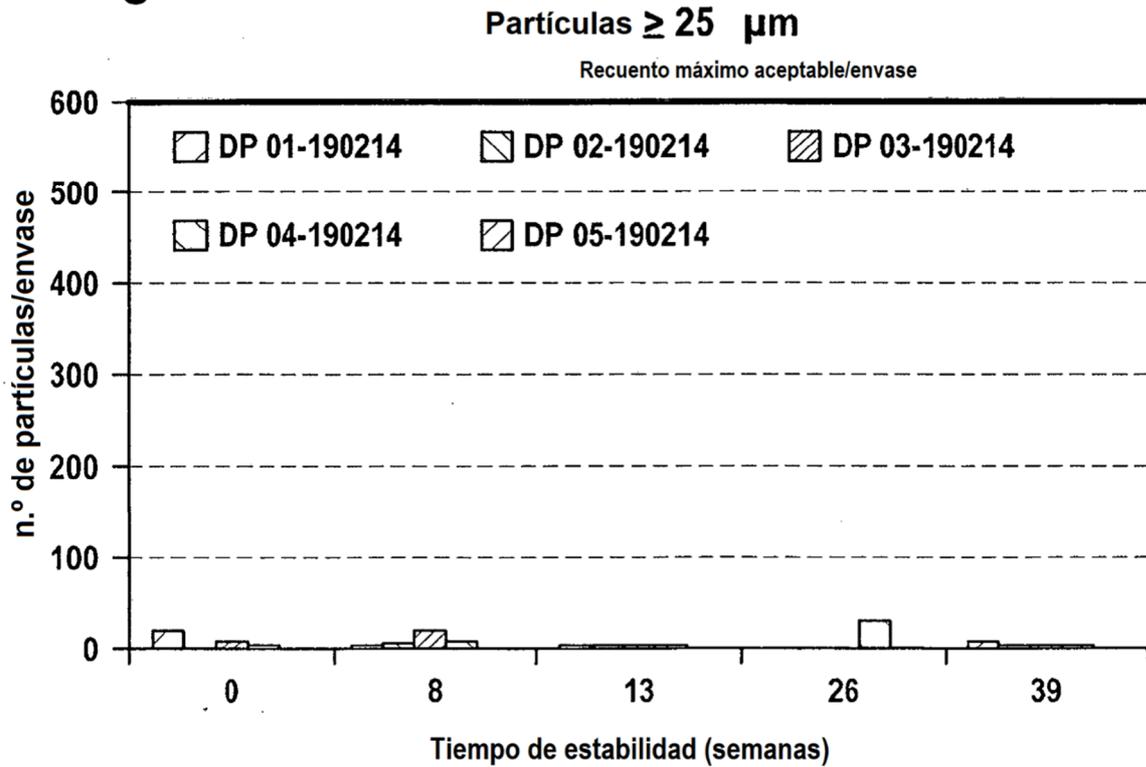


Fig. 20

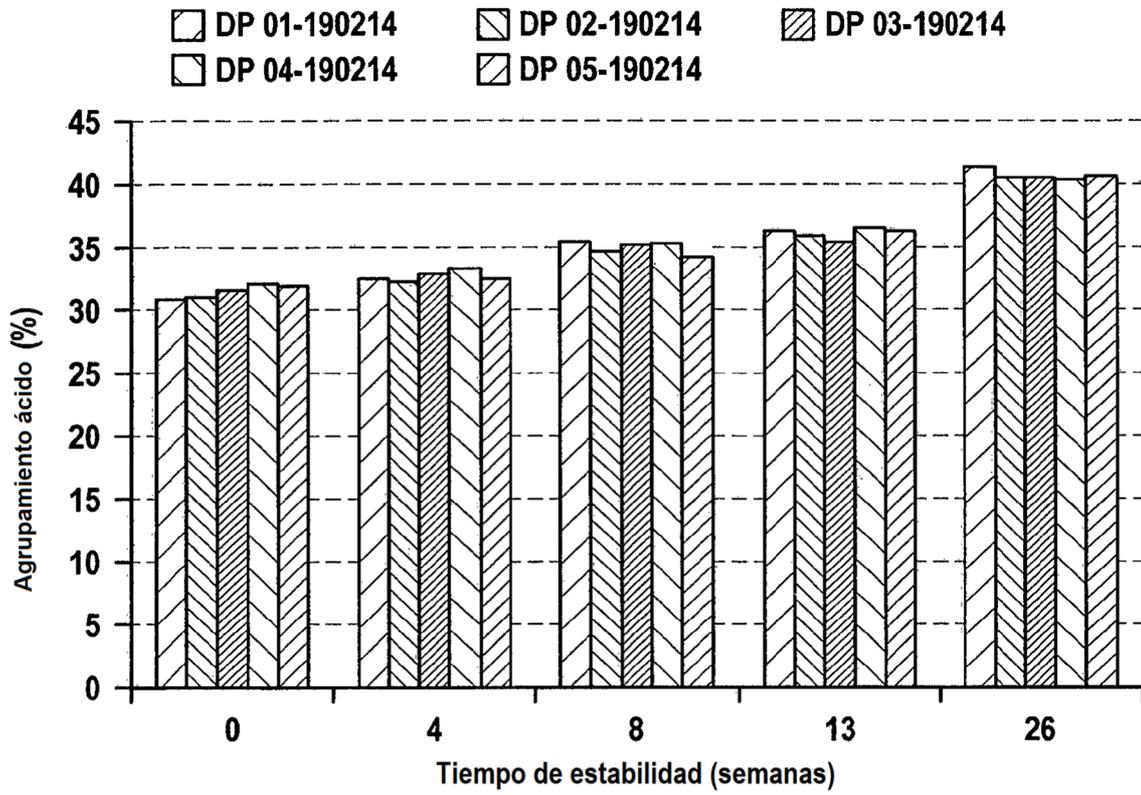


Fig. 21

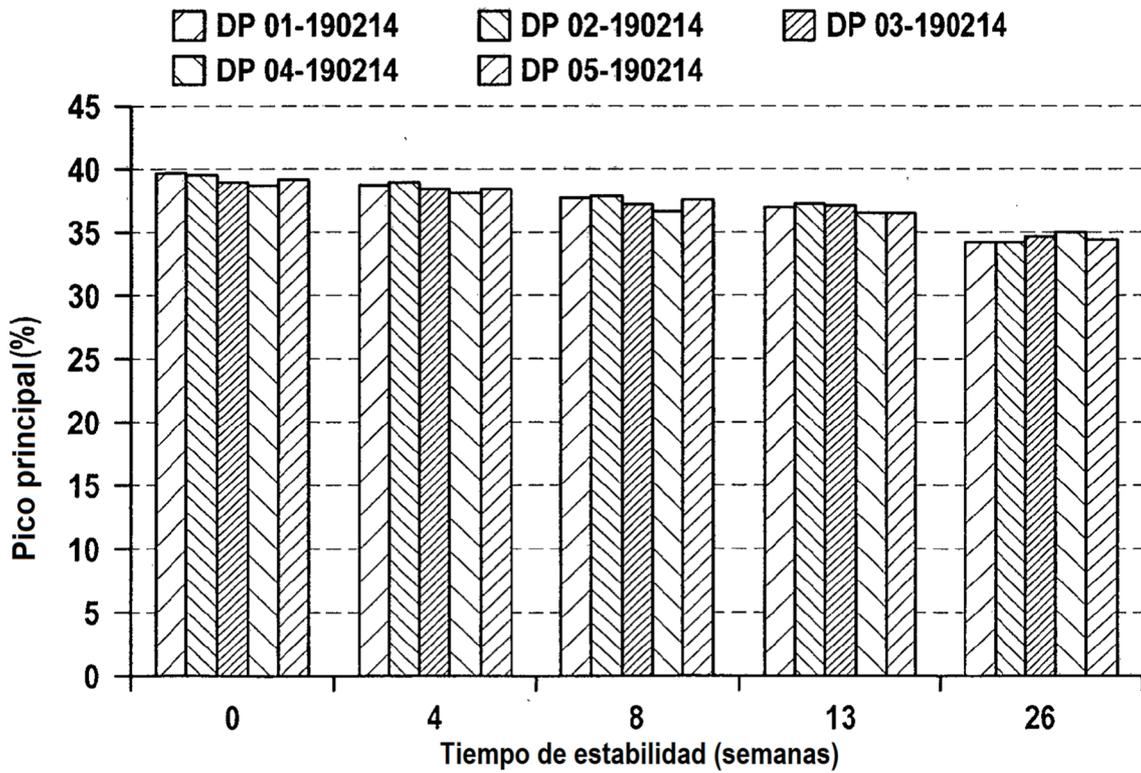


Fig. 22

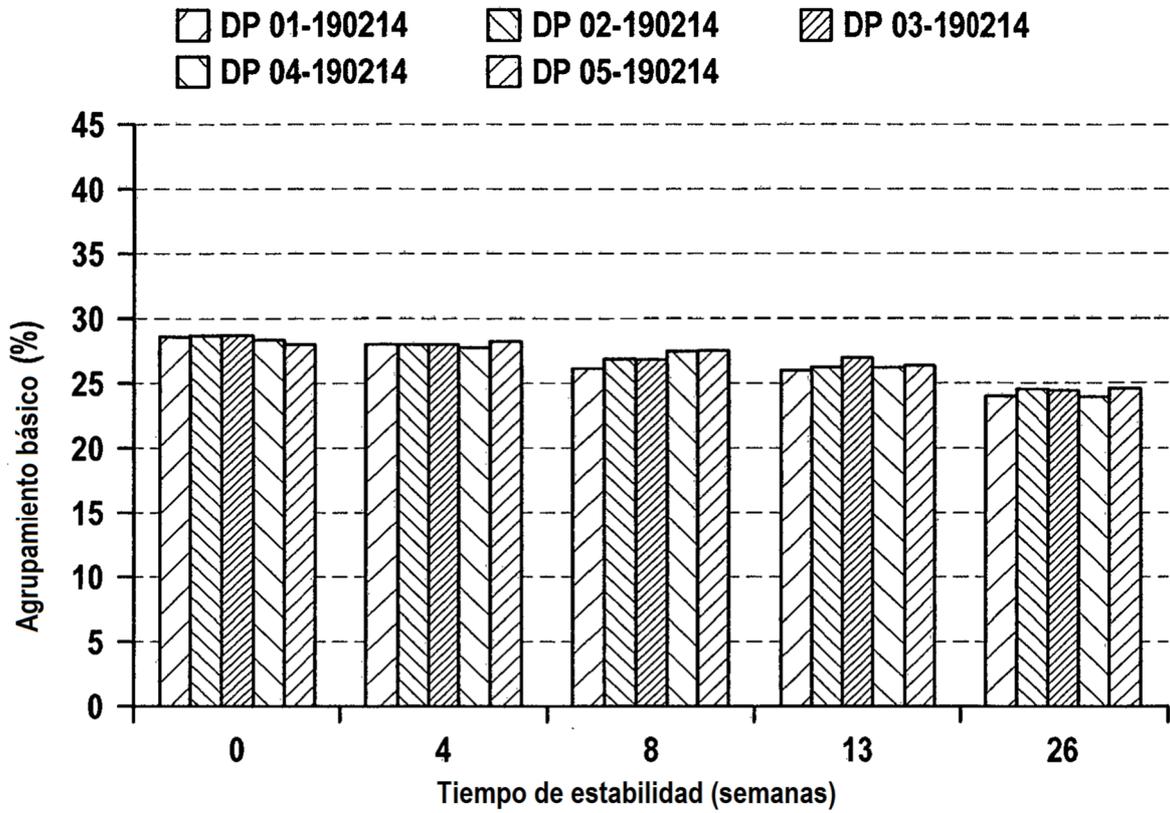


Fig. 23

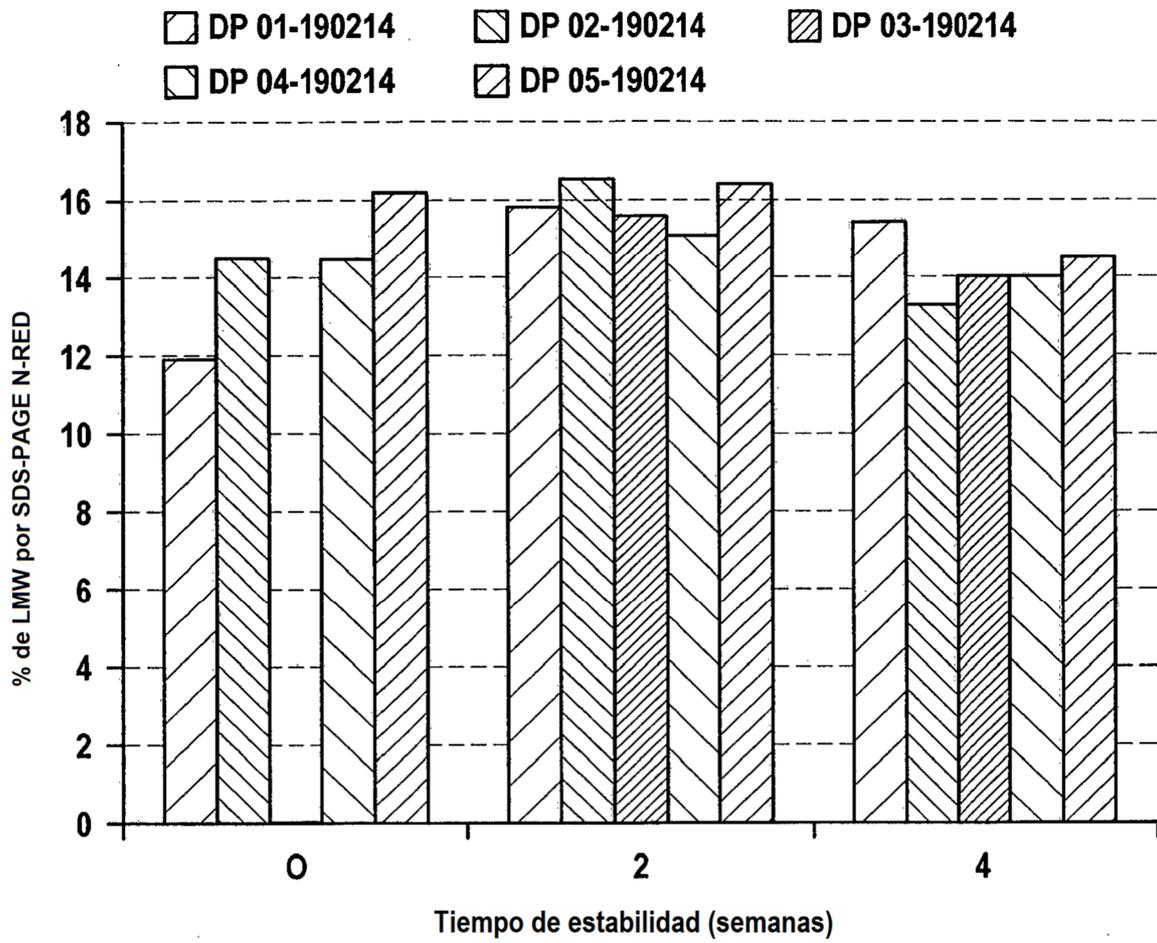


Fig. 24

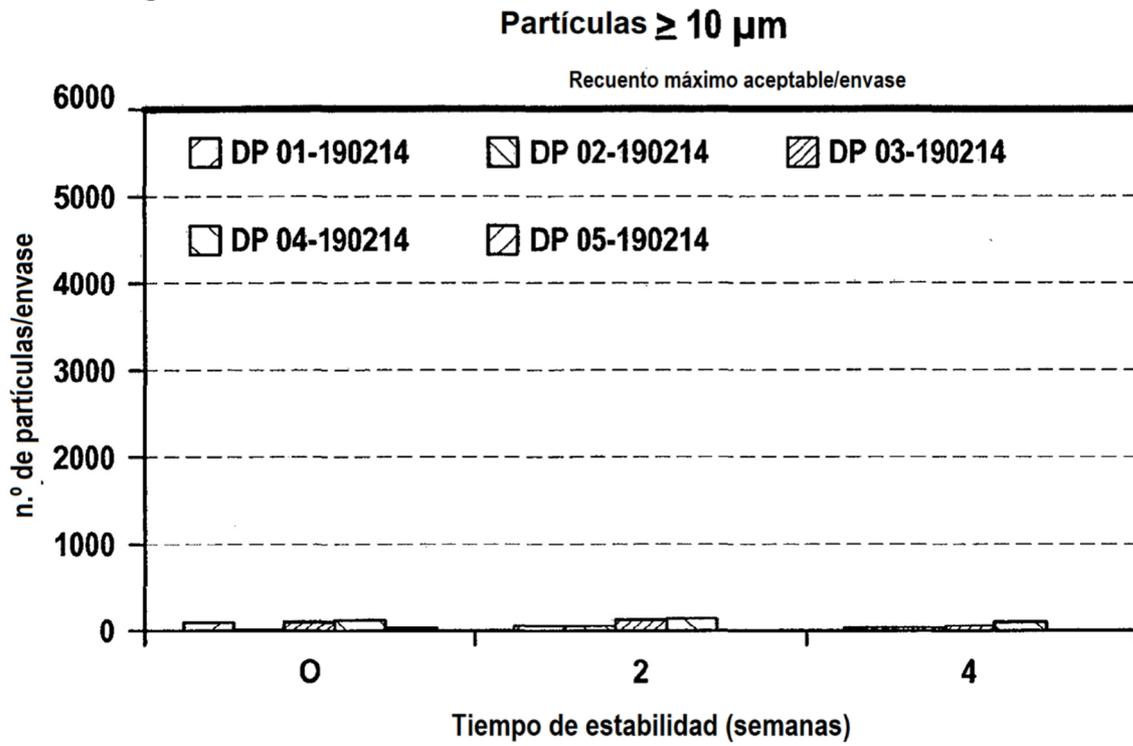


Fig. 25

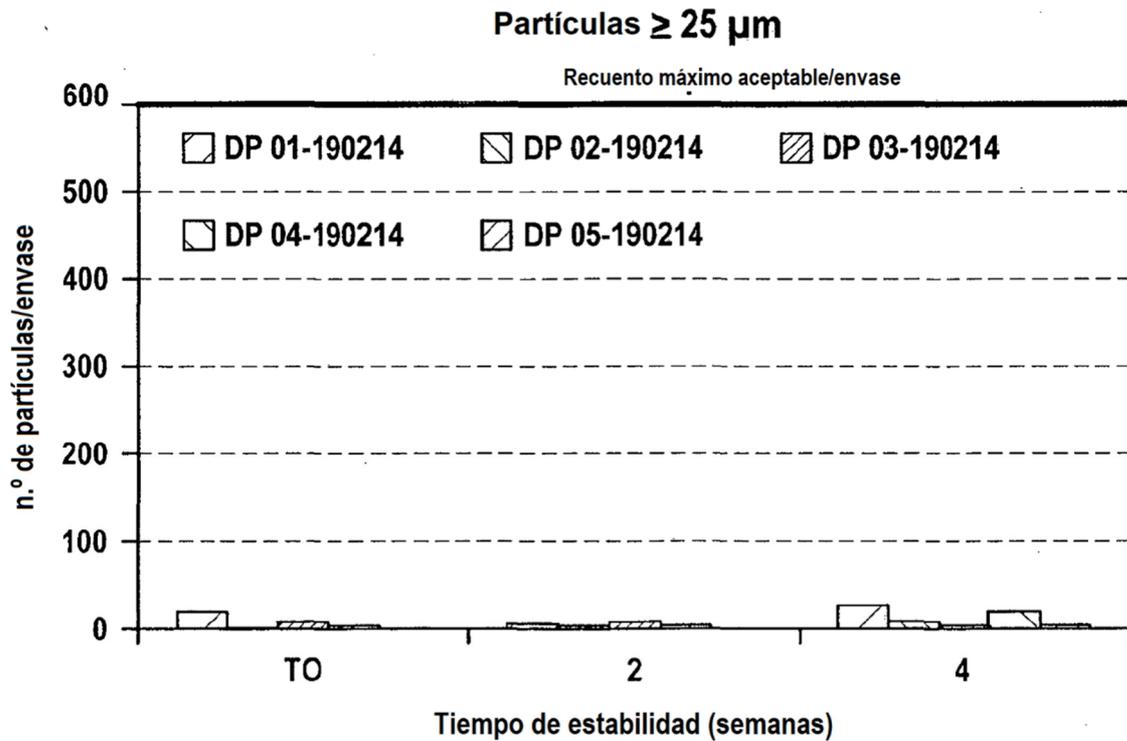


Fig. 26

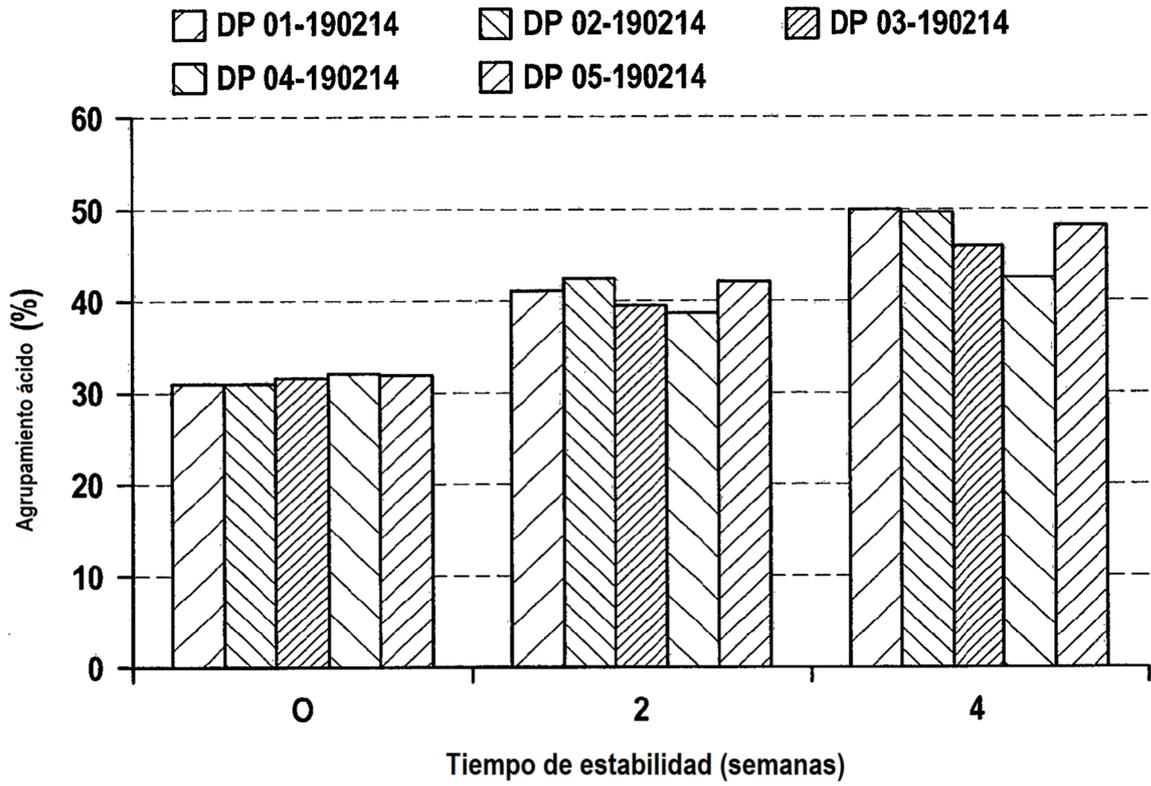


Fig. 27

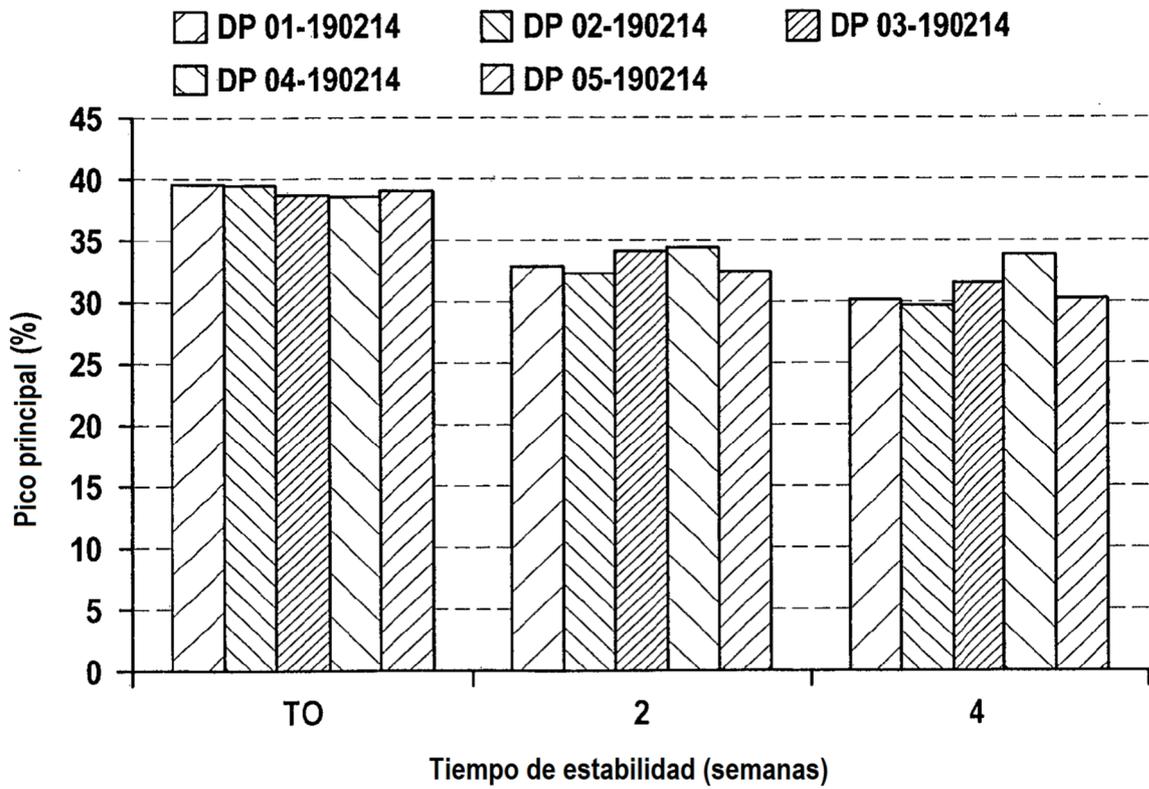


Fig. 28

