



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020021255-5 A2



(22) Data do Depósito: 17/04/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 02/02/2021

(54) Título: FORMULAÇÕES TAMPONADAS DE BEVACIZUMABE PARA USO NO TRATAMENTO DE DOENÇAS

(51) Int. Cl.: A61K 39/395; C07K 16/22.

(30) Prioridade Unionista: 07/12/2018 US 62/776,686; 17/04/2018 US 62/658,772.

(71) Depositante(es): OUTLOOK THERAPEUTICS, INC..

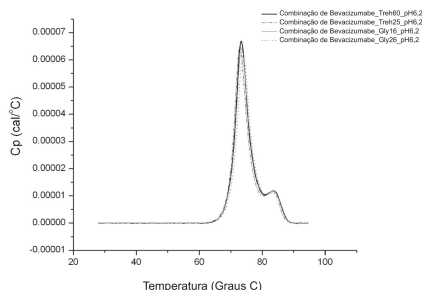
(72) Inventor(es): CHRIS YONAN; WIPHUSANEE DENDAMRONGVIT; MARTHA HEALY-FRIED.

(86) Pedido PCT: PCT US2019027790 de 17/04/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/204380 de 24/10/2019

(85) Data da Fase Nacional: 16/10/2020

(57) Resumo: "FORMULAÇÕES TAMPONADAS DE BEVACIZUMABE PARA USO NO TRATAMENTO DE DOENÇAS". A invenção fornece formulações aquosas tamponadas de bevacizumabe. A invenção fornece ainda métodos de preparação de formulações tamponadas de bevacizumabe. A invenção fornece métodos de tratamento de distúrbios oculares, particularmente degeneração macular relacionada à idade úmida e edema macular pela administração das composições de anticorpo tamponadas da descrição.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **“FORMULAÇÕES TAMPONADAS DE BEVACIZUMABE PARA USO NO TRATAMENTO DE DOENÇAS”**.

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica prioridade ao Pedido Provisório Norte-americano No. 62/776.686 depositado em 7 de dezembro de 2018 e ao Pedido Provisório Norte-americano No. 62/658.772 depositado em 17 de abril de 2018, os conteúdos de cada um dos quais são incorporados por referência neste documento, na sua totalidade e para todos os efeitos.

INCORPORAÇÃO DE LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[0002] O conteúdo do arquivo de texto denominado "ONBI-013_001WO_SeqListing_ST25.txt", que foi criado em 16 de abril de 2019 e tem 9 KB de tamanho, são incorporados neste documento por referência em sua totalidade.

CAMPO DE INVENÇÃO

[0003] A invenção refere-se geralmente ao campo da química da formulação de anticorpos. Mais particularmente, a invenção se refere a formulações tamponadas de um anticorpo para fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), cujas formulações aumentam a estabilidade térmica e a estabilidade coloidal do anticorpo, aumentando assim o armazenamento de longo prazo do anticorpo. Essas formulações estáveis de anticorpos podem ser utilizadas em métodos de tratamento de distúrbios oculares, incluindo aqueles em que o VEGF é desregulado.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0004] Como parte da Biologics Price Competition and Innovation Act (BPCIA), um fármaco biológico (produzido em ou derivado de organismos vivos) pode ser demonstrado ser "biossimilar" se os dados mostrarem que, entre outras coisas, o produto é "altamente semelhante" a um produto biológico já aprovado. O produto biossimilar deve re-

ter pelo menos a função biológica e a eficácia do tratamento do produto biológico aprovado pela U.S. Food and Drug Agency. O produto bioequivalente pode ser formulado de forma diferente, porém, do produto biológico aprovado. A formulação pode melhorar a estabilidade e o armazenamento em prateleira do fármaco biológico e também pode melhorar a eficácia no tratamento de uma doença ou condição específica. A formulação também pode melhorar outros aspectos da administração, incluindo uma redução no desconforto do paciente ou outros efeitos indesejáveis que um paciente pode sentir após a administração do produto biológico aprovado.

[0005] As moléculas de anticorpos podem ser usadas como fármacos biológicos, e muitos desses anticorpos são aprovados para uso em seres humanos. As moléculas de anticorpos podem ser produzidas como um bioequivalente e reformuladas de acordo. Permanece uma necessidade na técnica de bioequivalentes de anticorpos de alta qualidade.

[0006] O anticorpo bevacizumabe comercializado sob a marca Avastin® (Genentech, Inc., San Francisco, CA) é conhecido por agregar em duas formas sob condições de armazenamento - um agregado não covalente, reversível e um agregado covalente, não reversível. Acredita-se que o último (agregado covalente) ocorra no domínio de ligação ao antígeno e, portanto, reduza o número de sítios de ligação disponíveis para se ligar ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Como resultado, a potência do anticorpo é diminuída. A redução de tais agregados é geralmente desejável e, particularmente, para um anticorpo como o bevacizumabe. A presente descrição aborda essas necessidades na técnica.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0007] Em algumas modalidades, a descrição apresenta um método de tratamento de um distúrbio ocular em um indivíduo em necessidade, o referido método compreendendo a administração ao indivíduo

de uma formulação de anticorpo tamponada compreendendo um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

[0008] Em algumas modalidades da descrição, o distúrbio ocular é um distúrbio retiniana, esclera, vítreo, cristalino, pupila, íris, córnea, coróide, nervo óptico, vasculatura retinal, corpo ciliar ou ângulo do olho. Em algumas modalidades da descrição, o distúrbio ocular é um distúrbio retiniana ou da coróide. Em algumas modalidades da descrição, o distúrbio ocular retiniana ou coróide é degeneração macular relacionada à idade, edema macular, edema macular diabético (DME), retinopatia, retinopatia diabética, degeneração miópica, neovascularização coroidal idiopática, neovascularização inflamatória coroidal, neovascularização retinal, vasculopatia coroidal poliploide, neovascularização ocular, oclusão da veia retinal ramificada (BRVO), oclusão da veia retinal central, coriorretinopatia serosa central, retinite, retinite pigmentosa, doença de Stargardt, síndrome de Usher, degeneração retinal, endoftalmite, vitreorretinopatia exsudativa familiar, telangiectasia justafoveal idiopática, degeneração em treliça, buraco macular, vasculatura fetal persistente, oclusão da artéria retiniana ou retinoblastoma.

[0009] Em algumas modalidades da descrição, o distúrbio ocular retiniana ou coróide é degeneração macular relacionada à idade, degeneração macular úmida relacionada à idade ou degeneração macular relacionada à idade neovascular. Em algumas modalidades da descrição, o distúrbio ocular retiniana ou coróide é degeneração macular úmida relacionada à idade. Em algumas modalidades da descrição, o distúrbio ocular retiniana ou da coróide é o edema macular.

[0010] Em algumas modalidades da descrição, a formulação de anticorpo tamponado é administrada ao indivíduo por via oral, por via

intravenosa, intravítrea, intramuscular, tópica, subcutânea, supracoroidal, via colírio ou via absorção direta através dos tecidos da membrana mucosa. Em algumas modalidades da descrição, a formulação de anticorpo tamponado é administrada ao indivíduo por uma injeção intravítrea.

[0011] Em algumas modalidades da descrição, a formulação de anticorpo tamponado é administrada ao indivíduo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 28, 29, 30 ou 31 vezes por mês. Em algumas modalidades da descrição, a formulação de anticorpo tamponado é administrada ao indivíduo a cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 semanas. Em algumas modalidades da descrição, a formulação de anticorpo tamponado é administrada ao indivíduo por um período de tempo que dura 4, 8, 16, 24, 36 ou 52 semanas. Em algumas modalidades da descrição, a formulação de anticorpo tamponado é administrada ao indivíduo por um período de tempo de 1, 2, 3, 4, 5 ou 10 anos. Em algumas modalidades da descrição, a formulação de anticorpo tamponado tem meia-vida de 10 a 50 dias.

[0012] Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende de cerca de 10 mg/ml a cerca de 50 mg/ml do anticorpo. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende de cerca de 15 mg/ml a cerca de 35 mg/ml do anticorpo. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende de cerca de 23 mg/ml a cerca de 27 mg/ml do anticorpo. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende de cerca de 24 mg/ml a cerca de 27 mg/ml do anticorpo. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende de cerca de 25 mg/ml a cerca de 26 mg/ml do anticorpo. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende cerca de 25,5 mg/ml do anticorpo. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende cerca de 25 mg/ml do anticorpo.

[0013] Em algumas modalidades da descrição, a formulação com-

preende de cerca de 30 mM a cerca de 70 mM de fosfato de citrato. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende de cerca de 40 mM a cerca de 60 mM de fosfato de citrato. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende de cerca de 48 mM a cerca de 52 mM de fosfato de citrato. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende de cerca de 49 mM a cerca de 51 mM de fosfato de citrato. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende de cerca de 50 mM a cerca de 51 mM de fosfato de citrato.

[0014] Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende de cerca de 30 mM a cerca de 70 mM de fosfato de sódio. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende de cerca de 40 mM a cerca de 60 mM de fosfato de sódio. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende de cerca de 48 mM a cerca de 52 mM de fosfato de sódio. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende de cerca de 49 mM a cerca de 51 mM de fosfato de sódio. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende de cerca de 50 mM a cerca de 51 mM de fosfato de sódio.

[0015] Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico ou fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico. Em algumas modalidades da descrição, o tampão compreende cerca de 50 mM de fosfato de sódio. Em algumas modalidades da descrição, o tampão compreende cerca de 51 mM de fosfato de sódio.

[0016] Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende de cerca de 120 mM a cerca de 180 mM de trealose. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende de cerca de 140 mM a cerca de 180 mM de trealose. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende de cerca de 150 mM a cerca

de 170 mM de trealose. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende de cerca de 157 mM a cerca de 161 mM de trealose. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende de cerca de 158 mM a cerca de 160 mM de trealose. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende cerca de 159 mM de trealose. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende cerca de 160 mM de trealose.

[0017] Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende de cerca de 0,02 % (v/v) a cerca de 0,06 % (v/v) de polissorbato 20. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende cerca de 0,03 % (v/v) a cerca de 0,05 % (v/v) de polissorbato 20. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende cerca de 0,04 % (v/v) de polissorbato 20.

[0018] Em algumas modalidades da descrição, a formulação tem um pH de cerca de 5,6. Em algumas modalidades da descrição, a formulação tem um pH de cerca de 5,8. Em algumas modalidades da descrição, a formulação tem um pH de cerca de 6. Em algumas modalidades da descrição, a formulação tem um pH de cerca de 6,1.

[0019] Em algumas modalidades da descrição, o tampão compreende de cerca de 11 mM a cerca de 19 mM de acetato de sódio. Em algumas modalidades da descrição, o tampão compreende de cerca de 13 mM a cerca de 17 mM de acetato de sódio. Em algumas modalidades da descrição, o tampão compreende de cerca de 13 mM a cerca de 16 mM de acetato de sódio. Em algumas modalidades da descrição, o tampão compreende cerca de 15 mM de acetato de sódio.

[0020] Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende de cerca de 165 mM a cerca de 185 mM de sacarose. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende de cerca de 170 mM a cerca de 180 mM de sacarose. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende de cerca de 174 mM a

cerca de 176 mM de sacarose. Em algumas modalidades da descrição, a formulação compreende cerca de 175 mM de sacarose.

[0021] Em algumas modalidades, a descrição apresenta um kit compreendendo: a) uma formulação de anticorpo tamponada compreendendo um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; e b) instruções para administrar a formulação de anticorpo em um método para tratar um distúrbio ocular. Em algumas modalidades da descrição, o distúrbio ocular é um distúrbio retiniana, esclera, vítreo, lente, pupila, íris, córnea, coroide, nervo óptico, vasculatura retinal, corpo ciliar ou ângulo do olho. Em algumas modalidades da descrição, o distúrbio ocular é um distúrbio retiniana ou da coroide. Em algumas modalidades da descrição, o distúrbio ocular retiniana ou coroide é degeneração macular relacionada à idade, edema macular, edema macular diabético (DME), retinopatia, retinopatia diabética, degeneração miópica, neovascularização coroidal idiopática, neovascularização inflamatória coroidal, neovascularização retinal, vasculopatia coroidal poliploide, neovascularização ocular, oclusão da veia retinal ramificada (BRVO), oclusão da veia retinal central, coriorretinopatia serosa central, retinite, retinite pigmentosa, doença de Stargardt, síndrome de Usher, degeneração retinal, endoftalmite, vitreorretinopatia exsudativa familiar, telangiectasia justafoveal idiopática, degeneração em treliça, buraco macular, vasculatura fetal persistente, oclusão da artéria retinal ou retinoblastoma. Em algumas modalidades da descrição, o distúrbio ocular retiniana ou coroide é degeneração macular relacionada à idade, degeneração macular úmida relacionada à idade ou degeneração macular relacionada à idade neovascular. Em algumas modalidades da descrição, o distúrbio ocular retiniana ou coroide é degeneração macular úmida relacionada à idade.

[0022] Em algumas modalidades da descrição, as instruções incluem instruções para a administração do anticorpo estável, conforme descrito em qualquer uma das reivindicações 1-56. Em algumas modalidades da descrição, o kit compreende ainda um dispositivo para injetar a formulação de anticorpo tamponada selecionada do grupo que compreende: uma seringa, agulha e cateter.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0023] A Figura 1 mostra um gráfico de DSC que mostra o efeito de vários estabilizadores na estabilidade térmica do bevacizumabe em um tampão de fosfato de sódio 50 mM. As condições 1, 2, 9 e 10 da Tabela 1 são mostradas no gráfico.

[0024] A Figura 2A mostra a porcentagem de agregados de bevacizumabe na Condição 1 (Bevacizumabe (Avastin®) Match), Condição 2 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 5,8), Condição 3 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 6,0), Condição 4 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,6) e Condição 5 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,8), quando armazenado a 5 °C durante um período de 18 meses.

[0025] Figura 2A (i): mostra a sobreposição cromatográfica (conforme medido por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) usando condições de injeção puras e quantifica agregados totais) para a Condição 1 (Bevacizumabe (Avastin®) Match), Condição 2 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 5,8) e Condição 3 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 6,0) quando o produto é armazenado a 5 °C durante um período de 18 meses.

[0026] A Figura 2A (ii) mostra a sobreposição cromatográfica (conforme medido por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) usando condições de injeção puras e quantifica os agregados totais) para a Condição 1 (Bevacizumabe (Avastin®) Match), Condição 4 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,6), e Condição 5 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,8) quando o produto é armazenado a 5 °C por um perí-

odo de 18 meses.

[0027] A Figura 2B mostra a porcentagem de dímero covalente de bevacizumabe na Condição 1 (Bevacizumabe (Avastin®) Match), Condição 2 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 5,8), Condição 3 (Citrato de Fosfato de Bevacizumabe, pH 6,0), Condição 4 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,6) e Condição 5 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,8), quando armazenado a 5 °C durante um período de 18 meses.

[0028] A Figura 2B (i) mostra a sobreposição cromatográfica (medida por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) usando condições de injeção diluída e quantifica o dímero covalente de bevacizumabe) para a Condição 1 (Bevacizumabe (Avastin®) Match), Condição 2 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 5,8) e Condição 3 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 6,0) quando o produto é armazenado a 5 °C durante 18 meses.

[0029] A Figura 2B (ii) mostra a sobreposição cromatográfica (conforme medido por Cromatografia de Exclusão por tamanho (SEC) usando condições de injeção diluída e quantifica o dímero covalente de bevacizumabe) para a Condição 1 (Bevacizumabe (Avastin®) Match), Condição 4 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,6) e Condição 5 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,8) quando o produto é armazenado a 5 °C durante 18 meses.

[0030] A Figura 2B (iii) mostra as mudanças na porcentagem de espécies ácidas de bevacizumabe conforme medido por cromatografia de permuta catiônica (CEX) na Condição 1 (Bevacizumabe (Avastin®) Match), Condição 2 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 5,8), Condição 3 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 6,0), Condição 4 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,6) e Condição 5 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,8), quando armazenado a 5 °C durante 18 meses.

[0031] A Figura 2B (iv) mostra a sobreposição cromatográfica (conforme medido por cromatografia de permuta catiônica (CEX) e

quantifica % ácida, % básica e % de espécie principal) para a Condição 1 (Bevacizumabe (Avastin®) Match), Condição 2 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 5,8) e Condição 3 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 6,0) quando o produto é armazenado a 5 °C durante 18 meses.

[0032] A Figura 2B (v) mostra a sobreposição cromatográfica (conforme medido por cromatografia de permuta catiônica (CEX) e quantifica % ácida, % básica e % de espécie principal) para a Condição 1 (Bevacizumabe (Avastin®) Match), Condição 4 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,6) e Condição 5 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,8) quando o produto é armazenado a 5 °C durante 18 meses.

[0033] A Figura 2C mostra a porcentagem de agregados de bevacizumabe na Condição 1 (Bevacizumabe (Avastin®) Match), Condição 2 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 5,8), Condição 3 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 6,0), Condição 4 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,6) e Condição 5 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,8), quando armazenado a 30 °C.

[0034] A Figura 2D mostra a porcentagem de dímero covalente de bevacizumabe na Condição 1 (Bevacizumabe (Avastin®) Match), Condição 2 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 5,8), Condição 3 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 6,0), Condição 4 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,6) e Condição 5 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,8), quando armazenado a 30 °C.

[0035] A Figura 2E mostra a porcentagem de agregados de bevacizumabe na Condição 1 (Bevacizumabe (Avastin®) Match), Condição 2 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 5,8), Condição 3 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 6,0), Condição 4 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,6), e Condição 5 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,8), quando armazenado a 37 °C.

[0036] A Figura 2F mostra a porcentagem de dímero covalente de

bevacizumabe na Condição 1 (Bevacizumabe (Avastin®) Match), Condição 2 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 5,8), Condição 3 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 6,0), Condição 4 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,6) e Condição 5 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,8), quando armazenado a 37 °C.

[0037] A Figura 2G mostra a porcentagem de agregados de bevacizumabe na Condição 1 (Bevacizumabe (Avastin®) Match), Condição 2 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 5,8), Condição 3 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 6,0), Condição 4 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,6) e Condição 5 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,8), quando submetido a estresse por agitação.

[0038] A Figura 2H mostra a porcentagem de dímero covalente de bevacizumabe na Condição 1 (Bevacizumabe (Avastin®) Match), Condição 2 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 5,8), Condição 3 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 6,0), Condição 4 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,6) e Condição 5 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,8), quando submetido a estresse por agitação.

[0039] A Figura 2I mostra a porcentagem de agregados de bevacizumabe na Condição 1 (Bevacizumabe (Avastin®) Match), Condição 2 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 5,8), Condição 3 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 6,0), Condição 4 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,6) e Condição 5 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,8), quando submetido a estresse por congelamento/descongelamento.

[0040] A Figura 2J mostra a porcentagem de dímero covalente de bevacizumabe na Condição 1 (Bevacizumabe (Avastin®) Match), Condição 2 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 5,8), Condição 3 (Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 6,0), Condição 4 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,6) e Condição 5 (Acetato de Bevacizumabe, pH 5,8), quando submetido a estresse por congelamento/descongelamento.

[0041] A Figura 3 mostra o tamanho hidrodinâmico do bevacizumabe com alteração da concentração.

[0042] A Figura 4 mostra um gráfico de triptofano de varredura de emissão de fluorescência intrínseca $T = 0$ com estabilidade acelerada.

[0043] A Figura 5 mostra um diagrama de fluxo do processo de fabricação da composição de anticorpo estável ONS-5010. O processo de Ultrafiltração e Diafiltração (UF/DF) é a penúltima etapa na fabricação da composição estável de anticorpos.

[0044] A Figura 6A mostra a concentração de proteína e HMWS % de material intermediário no processo de UF/DF no primeiro experimento. A barra à esquerda de cada par de barras indica a concentração de proteína. A barra à direita de cada par de barras indica HMWS %.

[0045] A Figura 6B mostra a concentração de proteína e HMWS % de material intermediário no processo de UF/DF na segunda execução. A barra à esquerda de cada par de barras indica a concentração de proteína. A barra à direita de cada par de barras indica HMWS %.

[0046] A Figura 6C mostra a concentração de proteína e HMWS % de material intermediário no processo de UF/DF na terceira execução. A barra à esquerda de cada par de barras indica a concentração de proteína. A barra à direita de cada par de barras indica HMWS %.

[0047] A Figura 7 mostra as alterações em HMWS % associadas à titulação da composição de anticorpo estável a um pH final de 6,1 e após uma filtração final de 0,2 μm , conforme medido por HPLC de exclusão por tamanho (SE-HPLC).

[0048] A Figura 8 mostra mudanças na HMWS % associado à diafiltração em 6 % (p/v) α,α' -trealose em água seguida pela adição de uma solução de fosfato de sódio 0,5 M e uma solução de polissorbato 20 a 10 % para uma composição de 5,8 g/L de mono-hidrato de fosfato de sódio monobásico, 1,2 g/L de fosfato de sódio dibásico, anidro,

60,0 g/L de α,α' trealose, 0,04 % de polissorbato 20.

[0049] A Figura 9 mostra o efeito do pH da substância de fármaco de carga (BDS) na HMWS %. A barra à esquerda de cada conjunto de barras indica HEPES. A barra no meio de cada conjunto de barras indica fosfato. A barra à direita de cada conjunto de barras indica hidróxido.

[0050] A Figura 10 mostra o efeito da variação da concentração de retentado ONS-5010 em HMWS %. A quarta barra (mais à direita) do conjunto de barras do meio (28 g/L) representa a alíquota na qual o ajuste de fosfato foi realizado com fosfato de sódio mono- e dibásico sólido, em vez de uma solução-mãe.

[0051] A Figura 11 mostra um diagrama de fluxo do processo de UF/DF para a fabricação do ONS-5010.

[0052] A Figura 12 mostra as curvas de fluxo de permeado inicial versus pressão de retentado para cinco taxas de fluxo de alimentação. As linhas no gráfico de cima para baixo representam 500 LMH, 400 LMH, 300 LMH, 200 LMH e 100 LMH.

[0053] A Figura 13 mostra o fluxo concentrado versus curvas de pressão de retentado para cinco taxas de fluxo de alimentação no tampão de partida (acetato de sódio 25 mM, 237 mM de cloreto de sódio, pH 5,0). As linhas no gráfico de cima para baixo representam 500 LMH, 400 LMH, 300 LMH, 200 LMH e 100 LMH.

[0054] A Figura 14 mostra o fluxo concentrado versus curvas de pressão de retentado para cinco taxas de fluxo de alimentação no tampão final. As linhas no gráfico de cima para baixo representam 500 LMH, 400 LMH, 300 LMH, 200 LMH e 100 LMH.

[0055] A Figura 15 mostra o impacto da concentração da composição de anticorpo estável na otimização da diafiltração. As linhas no gráfico de cima para baixo representam o tampão final (fosfato de sódio 51 mM, polissorbato a 0,04 %, pH 6,1) e o tampão de partida (ace-

tato de sódio 25 mM, 237 mM de cloreto de sódio, pH 5,0).

[0056] A Figura 16 demonstra o perfil de concentração-tempo de ONS-5010, Avastin licenciado nos EUA e Avastin licenciado em E.U. como a média. A linha vertical no tempo zero denota a dosagem.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0057] A invenção apresenta formulações tamponadas para armazenamento de bevacizumabe. O bevacizumabe pode compreender uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, ou região variável da cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 3 e uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. Na formulação tamponada, o bevacizumabe pode estar presente em uma concentração de cerca de 10 mg a cerca de 50 mg, ou mais preferencialmente de cerca de 15 mg/ml a cerca de 35 mg/ml, ou mais preferencialmente de cerca de 24 mg/ml a cerca de 27 mg/ml, ou mais preferencialmente cerca de 25 mg/ml ou cerca de 25,5 mg/ml. A formulação é aquosa e o tampão pode compreender fosfato de citrato ou acetato de sódio, e a formulação também pode compreender um estabilizador que compreende um açúcar, como trealose ou sacarose, bem como um tensoativo suave, como polissorbato 20. A formulação tem preferencialmente um pH ácido de cerca de 5,6 a cerca de 6,1 e, em alguns aspectos, o pH é de cerca de 5,6 ou cerca de 5,8 ou cerca de 6.

[0058] Em alguns aspectos, a formulação compreende um tampão que compreende de cerca de 10 mM a cerca de 100 mM de fosfato de citrato, de cerca de 100 mM a cerca de 200 mM de trealose e de cerca de 0,01 % (v/v) a cerca de 0,1 % (v/v) de polissorbato 20, e tem um pH de cerca de 5,7 a cerca de 6,1. O fosfato de citrato pode estar em uma faixa de concentração de cerca de 30 mM a cerca de 70 mM, de cerca

de 40 mM a cerca de 60 mM, de cerca de 48 mM a cerca de 52 mM, de cerca de 49 mM a cerca de 51 mM, ou de cerca de 50 mM a cerca de 51 mM, ou pode estar a uma concentração de cerca de 50 mM ou cerca de 51 mM. A trealose pode estar em uma faixa de concentração de cerca de 120 mM a cerca de 180 mM, de cerca de 150 mM a cerca de 170 mM, de cerca de 157 mM a cerca de 161 mM, de cerca de 140 mM a cerca de 180 mM, ou de cerca de 158 mM a cerca de 160 mM, ou a uma concentração de cerca de 159 mM ou cerca de 160 mM. O polissorbato pode estar em uma faixa de concentração de cerca de 0,02 % (v/v) a cerca de 0,06 % (v/v), ou de cerca de 0,03 % (v/v) a cerca de 0,05 % (v/v), ou pode estar a uma concentração de cerca de 0,04 % (v/v). O pH da formulação pode ser cerca de 5,8 ou pode ser cerca de 6.

[0059] Em alguns aspectos, a formulação compreende um tampão que compreende de cerca de 5 mM a cerca de 25 mM de tri-hidrato de acetato de sódio, de cerca de 150 mM a cerca de 201 mM de sacarose, e de cerca de 0,03 % (v/v) a cerca de 0,05 % (v/v) de polissorbato 20, e tem um pH de cerca de 5,5 a cerca de 5,9. O tri-hidrato de acetato de sódio pode estar em uma faixa de concentração de cerca de 11 mM a cerca de 19 mM, de cerca de 13 mM a cerca de 17 mM, ou de cerca de 13 mM a cerca de 16 mM, ou pode estar em uma concentração de cerca de 15 mM. A sacarose pode estar em uma faixa de concentração de cerca de 165 mM a cerca de 185 mM, de cerca de 170 mM a cerca de 180 mM, ou de cerca de 174 mM a cerca de 176 mM, ou pode estar em uma concentração de cerca de 175 mM.

[0060] A presente descrição fornece uma formulação de anticorpo tamponada, que compreende um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, um tampão que compreende de cerca de 10

mM a cerca de 100 mM de fosfato de citrato, de cerca de 100 mM a cerca de 200 mM de trealose e de cerca de 0,01 % (v/v) a cerca de 0,1 % (v/v) de polissorbato 20, em que a formulação de anticorpo tem um pH de cerca de 5,7 a cerca de 6,1. De preferência, a formulação de anticorpo é estável por pelo menos 18 meses quando armazenada em condições refrigeradas a 5 °C.

[0061] A presente descrição também fornece uma formulação de anticorpo tamponada, que compreende de cerca de 15 mg/ml a cerca de 35 mg/ml de um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, um tampão que compreende de cerca de 40 mM a cerca de 60 mM de fosfato de citrato, de cerca de 140 mM a cerca de 180 mM de trealose e de cerca de 0,02 % (v/v) a cerca de 0,06 % (v/v) de polissorbato 20, em que a formulação de anticorpo tem um pH de cerca de 5,7 a cerca de 6,1. De preferência, a formulação de anticorpo é estável por pelo menos 18 meses quando armazenada em condições refrigeradas a 5 °C.

[0062] A presente descrição fornece uma formulação de anticorpo tamponada, que compreende de cerca de 24 mg/ml a cerca de 27 mg/ml de um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve compreendendo o amino sequência de ácido da SEQ ID NO: 2, um tampão que compreende de cerca de 48 mM a cerca de 52 mM de fosfato de citrato, de cerca de 157 mM a cerca de 161 mM de trealose e de cerca de 0,03 % (v/v) a cerca de 0,05 % (v/v) de polissorbato 20, em que a formulação de anticorpo tem um pH de cerca de 5,8 a cerca de 6,0. Preferivelmente, a formulação de anticorpo é estável por pelo menos 18 meses quando armazenada em condições refrigeradas a 5 °C.

[0063] A presente descrição fornece uma formulação de anticorpo tamponada, que compreende um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, um tampão compreendendo cerca de 50 mM de fosfato de citrato, cerca de 159 mM de trealose e cerca de 0,04 % (v/v) de polissorbato 20, em que a formulação de anticorpo tem um pH de cerca de 5,8 ou cerca de 6. Preferencialmente, a formulação de anticorpo é estável por pelo menos 18 meses quando armazenado em condições de refrigeração a 5 °C.

[0064] A presente descrição também fornece uma formulação de anticorpo tamponada, que compreende de cerca de 20 mg/ml a cerca de 30 mg/ml de um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, um tampão que compreende de cerca de 5 mM a cerca de 25 mM de acetato de sódio, de cerca de 150 mM a cerca de 201 mM de sacarose, e de cerca de 0,03 % (v/v) a cerca de 0,05 % (v/v) de polissorbato 20, em que a formulação de anticorpo tem um pH de cerca de 5,6 a cerca de 5,8. De preferência, a formulação de anticorpo é estável por pelo menos 18 meses quando armazenada em condições refrigeradas a 5 °C.

[0065] A presente descrição também fornece uma formulação de anticorpo tamponada, que compreende de cerca de 24 mg/ml a cerca de 26 mg/ml de um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, um tampão que compreende de cerca de 13 mM a cerca de 17 mM de acetato de sódio, de cerca de 170 mM a cerca de 180 mM de sacarose, e de cerca de 0,03 % (v/v) a cerca de 0,05 % (v/v) de polis-

sorbato 20, em que a formulação de anticorpo tem um pH de cerca de 5,6 a cerca de 5,8. De preferência, a formulação de anticorpo é estável por pelo menos 18 meses quando armazenada em condições refrigeradas a 5 °C.

[0066] A presente descrição também fornece uma formulação de anticorpo tamponada, que compreende um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, um tampão compreendendo cerca de 15 mM de acetato de sódio, cerca de 175 mM de sacarose e cerca de 0,04 % (v/v) de polissorbato 20, em que a formulação de anticorpo tem um pH de cerca de 5,6 ou cerca de 5,8. De preferência, a formulação de anticorpo é estável por pelo menos 18 meses quando armazenada em condições refrigeradas a 5 °C.

[0067] A presente descrição também fornece uma formulação de anticorpo tamponada, que compreende um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, um tampão compreendendo cerca de 15 mM de acetato de sódio, cerca de 175 mM de sacarose e cerca de 0,04 % (v/v) de polissorbato 20, em que a formulação de anticorpo tem um pH de cerca de 5,6 ou cerca de 5,8. De preferência, a formulação de anticorpo é estável por pelo menos 18 meses quando armazenada em condições refrigeradas a 5 °C.

[0068] A presente descrição também fornece um kit compreendendo qualquer formulação de anticorpo tamponado, que compreende um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 aqui descrita. O kit pode compreender ainda um dispositivo para injetar a for-

mulação de anticorpo em um indivíduo. O dispositivo pode compreender uma seringa, uma agulha, um cateter ou qualquer combinação dos mesmos. O kit pode compreender ainda instruções para o tratamento de um ou mais dos cânceres aqui descritos.

[0069] A presente descrição também fornece métodos para o tratamento de câncer em um indivíduo em necessidade, o método compreendendo a administração ao indivíduo de qualquer formulação de anticorpo tamponada, que compreende um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 aqui descrita em uma quantidade eficaz para tratar o referido câncer.

[0070] A presente descrição também fornece qualquer formulação de anticorpo tamponada, que compreende um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 aqui descrita para uso na fabricação de um medicamento para o tratamento do câncer.

[0071] Qualquer uma das formulações de anticorpos pode ser usada em um método para tratar um ou mais câncer de ovário epitelial recorrente resistente à platina, de trompa de Falópio ou peritoneal primário. Em geral, os métodos compreendem a administração da formulação, incluindo o anticorpo de bevacizumabe, a um indivíduo em necessidade, em uma quantidade eficaz para tratar um ou mais câncer epitelial recorrente resistente à platina, câncer de trompa de Falópio ou peritoneal primário. O indivíduo é preferencialmente um ser humano, e a formulação é preferencialmente administrada via infusão intravenosa ou injeção. Qualquer das formulações de anticorpos pode ser utilizada de forma semelhante na fabricação de um medicamento para o tratamento do câncer, tal como um ou mais dentre câncer de ovário epiteli-

al recorrente resistente à platina, de trompa de Falópio ou peritoneal primário, câncer cervical persistente, recorrente ou metastático, câncer colorretal metastático, câncer de mama de HER2 negativo metastático (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano), carcinoma de células renais metastático, glioblastoma ou câncer de pulmão de células não pequenas.

[0072] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado como comumente entendido por alguém versado na técnica à qual esta invenção pertence. Todas as patentes e publicações citadas neste documento são incorporadas por referência em sua totalidade e para todos os fins.

[0073] Em algumas modalidades, a descrição apresenta um método de produção de uma composição de anticorpo estável. Em algumas modalidades, o método compreende a ultrafiltração de uma composição de partida, por exemplo, uma composição de partida com um pH de cerca de 4,7 a cerca de 5,3. Em algumas modalidades, a composição inicial compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em um anticorpo e uma composição tampão inicial. Em algumas modalidades, a composição inicial compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em entre ou entre cerca de 4 mg/ml e 6 mg/ml de um anticorpo, tal como um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO : 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Em algumas modalidades, a ultrafiltração da composição inicial produz uma composição concentrada. Em algumas modalidades, a composição concentrada compreende entre ou entre cerca de 30 g/L e 40 g/L, incluindo os pontos finais, do anticorpo. Em algumas modalidades, o pH da composição concentrada está entre ou entre cerca de 4,0 e 6,0, tal como entre ou entre cerca de 4,5 e 5,5. Em

algumas modalidades, o pH da composição concentrada é ou é cerca de 5,0.

[0074] Em algumas modalidades, o método compreende a permuta (por exemplo, diafiltração) da composição tampão de partida por uma solução de permuta compreendendo 6 % de trealose (p/v) em água para produzir uma composição de trealose. Em algumas modalidades, a composição de trealose compreende entre ou entre cerca de 20 g/L e 50 g/L, entre ou entre cerca de 30 e 40 g/L, ou cerca de 35 g/L do anticorpo, incluindo os pontos finais. Em algumas modalidades, a composição de trealose compreende entre cerca de 30 g/L e cerca de 40 g/L do anticorpo, incluindo os pontos finais. Em algumas modalidades, o pH da composição de trealose está entre ou entre cerca de 4,0 e 6,0, tal como entre ou entre cerca de 4,5 e 5,5. Em algumas modalidades, o pH da composição de trealose é ou é cerca de 5,0.

[0075] Em algumas modalidades, o método compreende o contato da composição de trealose com uma composição de fosfato para produzir uma composição de pH ajustado. Em algumas modalidades, a composição de fosfato compreende entre ou entre cerca de 400 e 600 mM de fosfato de sódio, tal como entre ou entre cerca de 450 e 550 mM de fosfato de sódio. Em algumas modalidades, a composição de fosfato compreende cerca de 500 mM de fosfato de sódio. Em algumas modalidades, uma concentração final de fosfato de sódio na composição com pH ajustado está entre ou entre cerca de 40 e 60 mM, tal como entre ou entre cerca de 45 e 55 mM. Em algumas modalidades, a concentração final de fosfato de sódio na composição com pH ajustado é de cerca de 50 mM. Em algumas modalidades, o pH da composição com pH ajustado está entre ou entre cerca de 5,0 e 7,0, tal como entre ou entre cerca de 5,9 e 6,3, incluindo os pontos finais. Em algumas modalidades, o pH da composição com pH ajustado é de cerca de 6,1.

[0076] Em algumas modalidades, o método compreende a formulação da composição de pH ajustado para entrega a um indivíduo, produzindo assim uma composição de anticorpo estável. Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável compreende $\leq 15\%$ de espécies de alto peso molecular (HMWS), como $\leq 10\%$, $\leq 7,5\%$, $\leq 6\%$, $\leq 5\%$, $\leq 4\%$, $\leq 3\%$, $\leq 2,5\%$, $\leq 2\%$, $\leq 1,5\%$ ou ≤ 1 HMWS %. Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável compreende $\leq 6\%$ de HMWS.

[0077] Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável pode ser referida como ONS-5010.

[0078] Em algumas modalidades, a composição inicial tem um pH entre ou entre cerca de 4,0 e 6,0, tal como entre ou entre cerca de 4,5 e 5,5, ou entre cerca de 4,7 e 5,3. Em algumas modalidades, a composição inicial tem um pH de cerca de 5,0.

[0079] Em algumas modalidades, a composição tampão de partida compreende entre ou entre cerca de 10 e 40 mM de acetato de sódio, tal como entre ou entre cerca de 15 e 35 mM de acetato de sódio, ou entre ou entre cerca de 20 e 30 mM de acetato de sódio. Em algumas modalidades, a composição do tampão de partida compreende cerca de 25 mM de acetato de sódio. Em algumas modalidades, o tampão de partida compreende entre ou entre cerca de 200 e 300 mM de NaCl, tal como entre ou entre cerca de 225 e 240 mM de NaCl. Em algumas modalidades, o tampão de partida compreende cerca de 237 mM de NaCl. Em algumas modalidades, o pH da composição tampão de partida está entre ou entre cerca de 4,0 e 6,0, tal como entre ou entre cerca de 4,5 e 5,5. Em algumas modalidades, o pH da composição tampão de partida é de cerca de 5,0.

[0080] Em algumas modalidades, a ultrafiltração compreende o uso de uma membrana de 30 kDa. Em algumas modalidades, a referida membrana é uma membrana de polietersulfona. Em algumas mo-

dalidades, a membrana suporta uma carga de $\leq 1000 \text{ g/m}^2$, $\leq 750 \text{ g/m}^2$, $\leq 500 \text{ g/m}^2$ ou $\leq 250 \text{ g/m}^2$. Em algumas modalidades, a membrana suporta uma carga de $\leq$ cerca de 500 g/m^2 a $\leq$ cerca de 100 g/m^2 . Em algumas modalidades, a membrana suporta uma carga de $\leq$ cerca de 300 g/m^2 . Em algumas modalidades, a ultrafiltração tem uma taxa de fluxo de alimentação $\leq$ cerca de 450 LMH. Em algumas modalidades, a ultrafiltração tem uma taxa de fluxo de alimentação de cerca de 375 LMH. Em algumas modalidades, a ultrafiltração tem uma pressão de retentado de $\leq$ cerca de $1,76 \text{ kg/cm}^2$ (25 psi). Em algumas modalidades, a ultrafiltração tem uma pressão de retentado de $0,35 \text{ kg/cm}^2$ (5 psi) ou cerca de $0,35 \text{ kg/cm}^2$ (5 psi). Em algumas modalidades, a ultrafiltração tem uma pressão de transmembrana (TMP) de $\leq$ cerca de ($1,41 \text{ kg/cm}^2$ (20 psi)). Em algumas modalidades, a ultrafiltração tem uma pressão de transmembrana (TMP) de cerca de (15 psig).

[0081] Em algumas modalidades, a composição concentrada compreende entre ou entre cerca de 20 e 50 mg/ml do anticorpo, tal como entre ou entre cerca de 25 e 45 mg/ml, ou entre ou entre cerca de 30 e 40 mg/ml. Em algumas modalidades, a composição concentrada compreende 35 mg/ml do anticorpo. Em algumas modalidades, o pH da composição concentrada está entre ou entre cerca de 4,0 e 6,0, tal como entre ou entre cerca de 4,5 e 5,5. Em algumas modalidades, o pH da composição concentrada é ou é cerca de 5,0.

[0082] A descrição apresenta um método de produção de uma composição de anticorpo estável compreendendo a permuta da composição tampão de partida por uma solução de permuta compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em 6 % de trealose (p/v) em água para produzir uma composição de trealose. Em algumas modalidades, a composição de trealose compreende entre cerca de 30 g/L e cerca de 40 g/L, incluindo os pontos finais, do anticorpo. Em algumas modalidades, o pH da composição de trealose está entre

ou entre cerca de 4,0 e 6,0, tal como entre ou entre cerca de 4,5 e 5,5. Em algumas modalidades, o pH da composição de trealose é de cerca de 5,0.

[0083] Em algumas modalidades, a solução de permuta compreende 6 % (p/v) de α,α' -trealose em água. Em algumas modalidades, o pH da composição de permuta está entre ou entre cerca de 4,0 e 6,0, tal como entre ou entre cerca de 4,5 e 5,5. Em algumas modalidades, o pH da composição de permuta é cerca de 5,0. Em algumas modalidades, a composição de trealose compreende entre ou entre cerca de 20 e 50 g/L do anticorpo, tal como entre ou entre cerca de 25 e 45 g/L, ou entre ou entre cerca de 30 e 40 g/L. Em algumas modalidades, a composição de trealose compreende cerca de 35 g/L do anticorpo.

[0084] Os métodos da descrição podem incluir a concentração e despolarização da composição de trealose. Em algumas modalidades, a despolarização compreende a recirculação da composição de trealose a uma pressão de ≤ 30 psig. Em algumas modalidades, a recirculação é realizada por ≤ 60 minutos. Em algumas modalidades, a recirculação é realizada por cerca de 10 minutos. Em algumas modalidades, a concentração compreende o uso de *chase* de fluxo em tampão. Em algumas dessas modalidades, em que a concentração compreende o uso de fluxo em tampão, a composição de trealose compreende entre 27,5 g/L e 32,5 g/L, incluindo os pontos finais, do anticorpo.

[0085] Os métodos da descrição incluem o contato de uma composição de trealose com uma composição de fosfato para produzir uma composição de pH ajustado. Em algumas modalidades, a composição de fosfato compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em cerca de 500 mM de fosfato de sódio. Em algumas modalidades, a concentração final do fosfato de sódio na composição com pH ajustado é de cerca de 50 mM. Em algumas modalidades, o pH da composição com pH ajustado está entre ou entre cerca de 5,0 e 7,0, tal como

entre ou entre cerca de 5,9 e 6,3, incluindo os pontos finais. Em algumas modalidades, o pH da composição com pH ajustado é de cerca de 6,1.

[0086] Em algumas modalidades, a composição de fosfato compreende entre ou entre cerca de 450 e 550 mM de fosfato de sódio, entre ou entre cerca de 500 e 520 mM de fosfato de sódio, ou cerca de 510 mM de fosfato de sódio. Em algumas modalidades, a concentração final de fosfato de sódio na composição de pH ajustado está entre ou entre cerca de 45 e 55 mM, tal como cerca de 51 mM. Em algumas modalidades, a composição de fosfato compreende fosfato de sódio monobásico. Em algumas modalidades, a composição de fosfato compreende fosfato de sódio dibásico. Em algumas modalidades, a composição de fosfato compreende fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico. Em algumas modalidades, a composição de fosfato compreende fosfato de sódio dibásico anidro. Em algumas modalidades, a composição de fosfato compreende mono-hidrato de fosfato de sódio monobásico. Em algumas modalidades, a composição de fosfato compreende fosfato de sódio monobásico di-hidratado. Em algumas modalidades, a composição de fosfato compreende trealose. Em algumas modalidades, a composição de fosfato compreende α,α' -trealose. Em algumas modalidades, a composição de fosfato compreende entre ou entre cerca de 10 e 15 g/L de fosfato de sódio dibásico anidro, tal como cerca de 12 g/L de fosfato de sódio dibásico anidro. Em algumas modalidades, a composição de fosfato compreende entre cerca de 50 e 75 g/L de mono-hidrato de fosfato de sódio monobásico, tal como cerca de 58 g/L de mono-hidrato de fosfato de sódio monobásico. Em algumas modalidades, a composição de fosfato compreende entre ou entre cerca de 50 e 70 g/L ou entre ou entre cerca de 55 e 65 g/L de α,α' -trealose, tal como cerca de 60 g/L de α,α' -trealose. Em algumas modalidades, a composição de fosfato tem um pH entre ou

entre cerca de 5,0 e 7,0, tal como entre ou entre cerca de 5,5 e 6,0. Em algumas modalidades, a composição de fosfato tem um pH de 5,74.

[0087] Em algumas modalidades, a etapa de contato tem uma duração de entre 1 segundo e 3600 segundos, tal como entre ou entre cerca de 1000 e 3000, entre ou entre cerca de 1500 e 2500 segundos, incluindo os pontos finais, ou cerca de 1800 segundos.

[0088] Os métodos da descrição incluem a formulação da composição de pH ajustado para entrega a um indivíduo para produzir uma composição de anticorpo estável. Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável compreende ≤ 15 % de espécies de alto peso molecular (HMWS), como ≤ 10 %, $\leq 7,5$ %, ≤ 6 %, ≤ 5 %, ≤ 4 %, ≤ 3 %, $\leq 2,5$ %, ≤ 2 %, $\leq 1,5$ % ou ≤ 1 HMWS %. Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em ≤ 6 % de espécies de alto peso molecular (HMWS).

[0089] Em algumas modalidades, a etapa de formulação compreende o contato da composição de pH ajustado com uma composição de polissorbato. Em algumas modalidades, a composição de polissorbato compreende cerca de 20 %, cerca de 15 %, cerca de 10 %, cerca de 5 % ou cerca de 1 % (m/v) de polissorbato 20. Em algumas modalidades, a composição de polissorbato compreende cerca de 10 % (m/v) de polissorbato 20.

[0090] Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável tem um pH entre 5,9 e 6,3, inclusive dos pontos finais. Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável tem um pH de 6,1. Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável tem uma concentração final do anticorpo entre ou entre cerca de 15 e 35 mg/ml, tal como entre ou entre cerca de 20 e 30 mg/ml, incluindo os pontos finais. Em algumas modalidades, a composição de anticorpo

estável tem uma concentração final do anticorpo entre 22,5 mg/ml e 27,5 mg/ml, incluindo os pontos finais. Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável tem uma concentração final de entre ou entre cerca de 0,01 % e 0,1 % (m/v) de polissorbato 20, tal como entre ou entre cerca de 0,02 % e 0,06 % (m/v) de polissorbato 20. Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável tem uma concentração final de polissorbato 20 de 0,04 % (m/v).

[0091] Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável tem uma condutividade entre ou entre cerca de 2 e 6 mS/cm, tal como entre ou entre cerca de 3 e 5 mS/cm, inclusive dos pontos finais. Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável tem uma condutividade entre cerca de 3,5 e cerca de 4,5 mS/cm, incluindo os pontos finais.

[0092] Em algumas modalidades, um rendimento esperado de anticorpo na composição de anticorpo estável após a etapa de formulação é $\geq 80\%$, $\geq 85\%$ ou $\geq 90\%$. Em algumas modalidades, o rendimento esperado de anticorpo na composição de anticorpo estável após a etapa de formulação é $\geq 95\%$.

[0093] Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável compreende $\leq 15\%$, $\leq 12\%$, $\leq 10\%$, $\leq 8\%$, $\leq 7\%$, $\leq 6\%$ ou $\leq 5\%$ de HMWS vinte e quatro meses após a conclusão da etapa de formulação. Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável compreende $\leq 8\%$ de HMWS vinte e quatro meses após a conclusão da etapa de formulação. Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável se acumula entre ou entre cerca de 0,1 % e 1 %, 0,2 % e 0,6 %, ou 0,3 % e 0,4 %, inclusive dos pontos finais, de HMWS por mês após a conclusão da etapa de formulação. Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável se acumula entre 0,25 % e 0,50 %, incluindo os pontos finais, de HMWS por mês após a conclusão da etapa de formulação.

[0094] Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável compreende $\leq 5, 4, 3, 2,5, 2, 1,5, 1$ ou $0,5 \%$, inclusive dos pontos finais, oxidação de resíduos de metionina da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável compreende $\leq 2,5 \%$, inclusive dos pontos finais, oxidação de resíduos de metionina da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável compreende $\leq 5, 4, 3, 2,5, 2, 1,5, 1$ ou $0,5 \%$, inclusive dos pontos finais, oxidação de resíduos de metionina da sequência de aminoácidos da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável compreende $\leq 2,5 \%$, inclusive dos pontos finais, oxidação de resíduos de metionina da sequência de aminoácidos da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Em uma forma de realização particular, a oxidação de resíduos de metionina da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 compreende a oxidação da metionina na posição 258 da SEQ ID NO: 1.

[0095] Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável é armazenada a $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ em 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ou mais dias após a conclusão de a etapa de formulação. Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável é armazenada a $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ dentro de 60 dias após a conclusão da etapa de formulação. Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável é armazenada a $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ dentro de 60 dias após a data de fabricação da composição de anticorpo estável.

[0096] A composição de anticorpo estável pode ser usada para o tratamento de câncer em um indivíduo que dela necessite. Em algumas modalidades, o tratamento inclui a administração ao indivíduo da composição de anticorpo estável em uma quantidade eficaz para tratar o referido câncer. Em algumas modalidades, o indivíduo é um ser humano. O câncer pode ser câncer de ovário epitelial recorrente resisten-

te à platina, câncer de trompa de Falópio, câncer peritoneal primário, câncer cervical persistente, câncer cervical recorrente, câncer cervical metastático, câncer colorretal metastático, câncer de mama de HER2 negativo metastático, carcinoma de células renais metastático, glioblastoma ou câncer de pulmão de células não pequenas.

[0097] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado que comumente entendido por alguém versado na técnica a qual pertence esta descrição. No relatório descritivo, as formas singulares também incluem o plural, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Embora métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos descritos neste documento possam ser usados na prática ou no teste da presente descrição, métodos e materiais adequados são descritos abaixo. Todas as publicações, pedidos de patentes, patentes e outras referências aqui mencionadas são incorporadas por referência em sua totalidade para todos os fins. As referências citadas neste documento não são admitidas como técnica anterior à descrição reivindicada. Em caso de conflito, a presente especificação, incluindo definições, prevalecerá. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são apenas ilustrativos e não se destinam a ser limitantes. Outras características e vantagens da descrição serão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada e reivindicações.

[0098] Ao longo desta descrição, vários aspectos do objeto reivindicado são apresentados em um formato de intervalo. Deve ser entendido que a descrição em formato de intervalo é meramente por conveniência e brevidade e não deve ser interpretada como uma limitação inflexível no escopo do objeto reivindicado. Por conseguinte, a descrição de uma faixa deve ser considerada como tendo descrito especificamente todas as subfaixas possíveis, bem como valores numéricos individuais dentro dessa faixa. Por exemplo, onde uma faixa de valores

é fornecida, entende-se que cada valor intermediário, entre o limite superior e inferior dessa faixa e qualquer outro valor declarado ou intermediário nessa faixa declarada, está englobado dentro do objeto reivindicado. Os limites superior e inferior dessas faixas menores podem ser independentemente incluídos nas faixas menores e também são abrangidos dentro do objeto reivindicado, submetido a qualquer limite especificamente excluído na faixa declarada. Quando o intervalo declarado inclui um ou ambos os limites, faixas excluindo um ou ambos os limites incluídos também estão incluídas no objeto reivindicado. Isso se aplica independentemente da amplitude do intervalo.

[0099] O termo "cerca de", quando aqui usado, refere-se à faixa de erro usual para o respectivo valor prontamente conhecido pelo especialista neste campo técnico. A referência a "cerca de" um valor ou parâmetro neste documento inclui (e descreve) modalidades que são direcionadas a esse valor ou parâmetro per se. Por exemplo, a descrição referente a "cerca de X" inclui a descrição de "X".

[00100] Vários termos relacionados aos aspectos da presente invenção são usados ao longo do relatório descritivo e das reivindicações. Esses termos devem ter seu significado comum na técnica, a menos que indicado de outra forma. Outros termos definidos especificamente devem ser interpretados de maneira consistente com a definição aqui fornecida.

[00101] Quando aqui usadas, as formas singulares "um", "uma" e "o/a" incluem referentes plurais, a menos que expressamente indicado de outra forma.

[00102] Quando aqui usados, os termos "compreendendo", "tendo" e "incluindo" abrangem os termos mais restritivos "consistindo essencialmente em" e "consistindo em".

[00103] Os termos indivíduo e paciente são usados alternadamente e incluem qualquer animal. Os assuntos incluem mamíferos, incluindo

mamíferos de companhia e de fazenda, bem como roedores, incluindo camundongos, coelhos e ratos e outros roedores. Indivíduos preferidos de primatas não humanos. Os seres humanos são temas altamente preferidos.

[00104] Os termos composição e formulação são usados indistintamente. Por conseguinte, uma formulação da descrição pode ser uma composição da descrição e uma composição da descrição pode ser uma formulação da descrição.

[00105] Foi observado de acordo com a invenção que as formulações de um anticorpo biossimilar de bevacizumabe, que se liga especificamente ao fator de crescimento endotelial vascular, podem ser tamponadas com fosfato de citrato, junto com trealose ou sacarose, ou tamponadas com acetato (em vez de fosfato de citrato) junto com a sacarose, com os tampões aumentando a estabilidade térmica e coloidal do anticorpo, ainda mais do que as formulações de bevacizumabe (vendidas sob o nome comercial Avastin®) atualmente aprovadas para uso do paciente. Em particular, as formulações inventivas demonstraram agregação de anticorpos significativamente mais baixa. Os tampões aumentam a vida útil da molécula de anticorpo. Por conseguinte, a descrição apresenta formulações tamponadas de um anticorpo biossimilar de bevacizumabe que incluem um carreador aquoso compreendendo um tampão compreendendo fosfato de citrato, bem como trealose ou sacarose, a um pH ácido ou, em alternativa, um carreador aquoso compreendendo um tampão compreendendo acetato, bem como sacarose, em pH ácido.

[00106] O anticorpo se liga especificamente a um epítopo no fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e o epítopo pode ser linear ou conformacional. Em alguns aspectos, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, ou uma sequência com pelo menos ou cerca de 80, 85, 90,

95 ou 99 % de identidade com a mesma. Em alguns aspectos preferidos, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Em alguns aspectos preferidos, o anticorpo compreende uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. De preferência, o anticorpo compreende um domínio constante da cadeia pesada e/ou um domínio constante da cadeia leve. Em aspectos altamente preferidos, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Em alguns aspectos, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 3 e da região variável da cadeia leve da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 4.

IgG1 de Cadeia Pesada de Bevacizumabe (SEQ ID NO:1)	
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW	INTYTGEPTY
AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP HYYGSSHWYF	DVWGQGTLVT
VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT	SGVHTFPAVL
QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH	TCPPCPAPEL
LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS TAPEVTCVWV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV	HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR	EPQVYTLPPS
REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGGSF	FLYSKLTVDK
SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKSLSLS PGK	
Cadeia leve de Bevacizumabe (SEQ ID NO: 2)	
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIFY TSS-	LHSGVPS
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKTAV	

AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
Região Variável de Cadeia Pesada de Bevacizumabe (SEQ ID NO: 3)
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP HYYGSSHWYF DVWGQGTLVT VSS
Região Variável de Cadeia Leve de Bevacizumabe (SEQ ID NO: 4)
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIFY TSS- LHSGVPS RFGSGSGGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKR

[00107] Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo de tamanho natural, que compreende regiões variáveis e constantes, embora em alguns aspectos, o anticorpo possa compreender um derivado ou fragmento ou porção de um anticorpo de tamanho natural que retém a ligação ao antígeno especificidade, e também preferivelmente retém a maior parte ou toda a afinidade, da molécula de anticorpo de tamanho natural. O anticorpo pode compreender modificações pós-translação (PTMs) ou frações, que podem impactar a atividade ou estabilidade do anticorpo. O anticorpo pode ser metilado, acetilado, glicosilado, sulfatado, fosforilado, carboxilado e/ou amidado e pode compreender outras porções que são bem conhecidas na técnica.

[00108] A formulação compreende preferencialmente uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz pode variar, dependendo da doença ou condição a ser tratada após a administração do anticorpo e/ou dependendo das características do indivíduo ao qual o anticorpo é administrado, tais como idade, sexo, altura, peso, estado de avanço ou estágio da doença ou condição, o número e eficácia de administrações anteriores, outros

agentes terapêuticos administrados ao indivíduo e outras características que são conhecidas pelo médico ou que de outra forma seriam levadas em consideração na determinação da dosagem apropriada. De preferência, uma quantidade terapeuticamente eficaz é uma quantidade que é eficaz para tratar cânceres, tais como câncer de pulmão de células não pequenas não escamosas, glioblastoma, carcinoma de células renais, câncer cervical, ou câncer de ovário epitelial, de trompa de Falópio ou peritoneal primário.

[00109] A formulação pode compreender de cerca de 10 mg/ml a cerca de 50 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 10 mg/ml a cerca de 40 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 10 mg/ml a cerca de 30 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 20 mg/ml a cerca de 50 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 20 mg/ml a cerca de 40 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 20 mg/ml a cerca de 30 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 15 mg/ml a cerca de 45 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 15 mg/ml a cerca de 35 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 15 mg/ml a cerca de 30 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 21 mg/ml a cerca de 29 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 22 mg/ml a cerca de 28 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 23 mg/ml a cerca de 27 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 24 mg/ml a cerca de 25 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 25 mg/ml a cerca de 30 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 25 mg/ml

a cerca de 26 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 25 mg/ml a cerca de 27 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 25 mg/ml a cerca de 28 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 25 mg/ml a cerca de 29 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 25 mg/ml a cerca de 30 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 24 mg/ml a cerca de 27 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 24 mg/ml a cerca de 28 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 24 mg/ml a cerca de 29 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 24 mg/ml a cerca de 30 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 25,5 mg/ml a cerca de 26 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 25,4 mg/ml a cerca de 25,9 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 25,6 mg/ml a cerca de 25,9 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 25,5 mg/ml a cerca de 25,8 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende de cerca de 25,5 mg/ml a cerca de 25,7 mg/ml do anticorpo. Esses intervalos incluem os valores inferiores e superiores que definem o intervalo. Em alguns aspectos, a formulação compreende cerca de 25 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende cerca de 25,5 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende cerca de 25,6 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende cerca de 25,7 mg/ml do anticorpo. Em alguns aspectos, a formulação compreende cerca de 25,8 mg/ml do anticorpo.

[00110] O anticorpo, por exemplo, nas concentrações descritas ou exemplificadas aqui, é preferencialmente formulado com um veículo

aquoso tamponado, e o veículo compreende preferencialmente água. A formulação de anticorpo tamponado está preferencialmente na forma líquida, e mais preferencialmente na forma líquida adequada para administração intravenosa. Assim, a quantidade de água na formulação tamponada pode variar de acordo com o volume desejado da infusão. Em alguns aspectos preferidos, o tampão compreende fosfato de citrato, trealose e um tensoativo suave, como polissorbato 20, e mantém a formulação de anticorpo em um pH ácido de cerca de 5,8 a cerca de 6,0. Em alguns aspectos preferidos alternativos, o tampão compreende acetato, sacarose e um tensoativo suave, como polissorbato 20, e mantém a formulação de anticorpo em um pH ácido de cerca de 5,6 a cerca de 5,8. Quando armazenado na formulação tamponada, o anticorpo é estável em armazenamento em condições normais de armazenamento.

[00111] O fosfato de citrato compreende uma combinação aquosa de dodeca-hidratado de fosfato de sódio dibásico e mono-hidrato de ácido cítrico, em uma solução pré-misturada compreendendo cerca de 0,2 M de fosfato de sódio dibásico e cerca de 0,1 M de ácido cítrico.

[00112] O tampão pode compreender de cerca de 10 mM a cerca de 100 mM de fosfato de citrato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 20 mM a cerca de 90 mM de fosfato de citrato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 30 mM a cerca de 70 mM de fosfato de citrato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 30 mM a cerca de 80 mM de fosfato de citrato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 40 mM a cerca de 70 mM de fosfato de citrato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 40 mM a cerca de 60 mM de fosfato de citrato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 45 mM a cerca de 55 mM de fosfato de citrato. Em alguns aspectos, o

tampão pode compreender a partir de cerca de 46 mM a cerca de 54 mM de fosfato de citrato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 47 mM a cerca de 53 mM de fosfato de citrato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 48 mM a cerca de 52 mM de fosfato de citrato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 49 mM a cerca de 51 mM de fosfato de citrato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 40 mM a cerca de 50 mM de fosfato de citrato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 50 mM a cerca de 75 mM de fosfato de citrato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 30 mM a cerca de 55 mM de fosfato de citrato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 40 mM a cerca de 55 mM de fosfato de citrato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 42 mM a cerca de 52 mM de fosfato de citrato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 46 mM a cerca de 52 mM de fosfato de citrato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 43 mM a cerca de 53 mM de fosfato de citrato. Esses intervalos incluem os valores inferiores e superiores que definem o intervalo. Em alguns aspectos, o tampão compreende cerca de 50 mM de fosfato de citrato.

[00113] O tampão de fosfato de citrato pode compreender a partir de cerca de 100 mM a cerca de 200 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 110 mM a cerca de 190 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 120 mM a cerca de 180 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 130 mM a cerca de 170 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 140 mM a cerca de 170 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão pode compre-

ender a partir de cerca de 150 mM a cerca de 170 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 155 mM a cerca de 165 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 150 mM a cerca de 160 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 153 mM a cerca de 164 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 152 mM a cerca de 167 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 154 mM a cerca de 164 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 155 mM a cerca de 163 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 156 mM a cerca de 162 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 157 mM a cerca de 161 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 158 mM a cerca de 160 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 158,5 mM a cerca de 158,9 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 158,6 mM a cerca de 158,8 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 158 mM a cerca de 161 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 159 mM a cerca de 161 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 157 mM a cerca de 160 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 157 mM a cerca de 159 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 150 mM a cerca de 159 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 159 mM a cerca de 160 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 159 mM a cerca de 165 mM de trealose.

Esses intervalos incluem os valores inferiores e superiores que definem o intervalo. Em alguns aspectos, o tampão compreende cerca de 159 mM de trealose. Em alguns aspectos, o tampão compreende cerca de 158,7 mM de trealose. Em alguns aspectos, a sacarose pode ser usada em qualquer uma dessas concentrações no lugar da trealose. Assim, por exemplo, o tampão de fosfato de citrato pode compreender sacarose como um estabilizador em vez de trealose.

[00114] O tampão de acetato-sacarose pode compreender de cerca de 1 mM a cerca de 30 mM de acetato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 5 mM a cerca de 25 mM de acetato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 10 mM a cerca de 20 mM de acetato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 11 mM a cerca de 19 mM de acetato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 12 mM a cerca de 18 mM de acetato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 13 mM a cerca de 15 mM de acetato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 10 mM a cerca de 15 mM de acetato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 12 mM a cerca de 16 mM de acetato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 12 mM a cerca de 15 mM de acetato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 13 mM a cerca de 16 mM de acetato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 13 mM a cerca de 17 mM de acetato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 14 mM a cerca de 18 mM de acetato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 14 mM a cerca de 16 mM de acetato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 15 mM a cerca de 20 mM de acetato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 5

mM a cerca de 15 mM de acetato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 11 mM a cerca de 17 mM de acetato. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender de cerca de 15 mM a cerca de 16 mM de acetato. Esses intervalos incluem os valores inferiores e superiores que definem o intervalo. Em alguns aspectos, o tampão compreende cerca de 15 mM de acetato. De preferência, o acetato é acetato de sódio tri-hidratado.

[00115] O tampão de acetato-sacarose ou fosfato de citrato-sacarose pode compreender a partir de cerca de 100 mM a cerca de 250 mM de sacarose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 125 mM a cerca de 225 mM de sacarose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 150 mM a cerca de 200 mM de sacarose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 155 mM a cerca de 195 mM de sacarose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 160 mM a cerca de 190 mM de sacarose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 165 mM a cerca de 185 mM de sacarose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 166 mM a cerca de 184 mM de sacarose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 167 mM a cerca de 183 mM de sacarose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 168 mM a cerca de 182 mM de sacarose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 169 mM a cerca de 181 mM de sacarose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 170 mM a cerca de 180 mM de sacarose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 171 mM a cerca de 179 mM de sacarose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 172 mM a cerca de 178 mM de sacarose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 174 mM a

cerca de 177 mM de sacarose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 174 mM a cerca de 176 mM de sacarose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 175 mM a cerca de 175.5 mM de sacarose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 175.2 mM a cerca de 175.4 mM de sacarose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 175 mM a cerca de 185 mM de sacarose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 165 mM a cerca de 175 mM de sacarose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 170 mM a cerca de 190 mM de sacarose. Em alguns aspectos, o tampão pode compreender a partir de cerca de 150 mM a cerca de 175 mM de sacarose. Esses intervalos incluem os valores inferiores e superiores que definem o intervalo. Em alguns aspectos, o tampão compreende cerca de 175 mM de sacarose. Em alguns aspectos, o tampão compreende cerca de 175,3 mM de sacarose.

[00116] A formulação de anticorpo (por exemplo, com o fosfato de citrato-trealose ou o tampão de acetato-sacarose) compreende preferencialmente um tensoativo não iônico. Mais preferencialmente, o tensoativo não iônico compreende polissorbato 20 (pode compreender polissorbato da marca Tween® 20 da Croda International Plc, Yorkshire, England). A formulação de anticorpo, incluindo o anticorpo e o tampão aquoso, compreende preferencialmente de cerca de 0,01 % a cerca de 0,1 % (em volume) de polissorbato 20. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo compreende de cerca de 0,02 % a cerca de 0,09 % (em volume) de polissorbato 20. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo compreende de cerca de 0,03 % a cerca de 0,08 % (em volume) de polissorbato 20. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo compreende de cerca de 0,01 % a cerca de 0,07 % (em volume) de polissorbato 20. Em alguns aspectos, a formulação de anti-

corpo compreende de cerca de 0,02 % a cerca de 0,06 % (em volume) de polissorbato 20. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo compreende de cerca de 0,03 % a cerca de 0,05 % (em volume) de polissorbato 20. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo compreende de cerca de 0,04 % a cerca de 0,06 % (em volume) de polissorbato 20. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo compreende de cerca de 0,02 % a cerca de 0,05 % (em volume) de polissorbato 20. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo compreende de cerca de 0,02 % a cerca de 0,04 % (em volume) de polissorbato 20. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo compreende de cerca de 0,03 % a cerca de 0,06 % (em volume) de polissorbato 20. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo compreende de cerca de 0,01 % a cerca de 0,05 % (em volume) de polissorbato 20. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo compreende de cerca de 0,03 % a cerca de 0,04 % (em volume) de polissorbato 20. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo compreende cerca de 0,04 % a cerca de 0,05 % (em volume) de polissorbato 20. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo compreende de cerca de 0,035 % a cerca de 0,045 % (em volume) de polissorbato 20. Essas faixas incluem as quantidades inferiores e superiores que definem o intervalo. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo compreende cerca de 0,04 % (em volume) de polissorbato 20.

[00117] A formulação de anticorpo (por exemplo, com o fosfato de citrato-trealose/sacarose ou o tampão de acetato-sacarose) é preferencialmente tamponada a um pH ácido. A formulação tem preferencialmente um pH de cerca de 5,3 a cerca de 6,5. Em alguns aspectos, a formulação tem um pH de cerca de 5,4 a cerca de 6,4. Em alguns aspectos preferidos, a formulação tem um pH de cerca de 5,4 a cerca de 5,9. Em alguns aspectos preferidos, a formulação tem um pH de cerca de 5,5 a cerca de 5,8. Em alguns aspectos preferidos, a formulação

tem um pH de cerca de 5,6 a cerca de 5,8. Em alguns aspectos preferidos, a formulação tem um pH de cerca de 5,6 a cerca de 5,9. Em alguns aspectos, a formulação tem um pH de cerca de 5,5 a cerca de 5,3. Em alguns aspectos preferidos, a formulação tem um pH de cerca de 5,6 a cerca de 6,2. Em alguns aspectos, a formulação tem um pH de cerca de 5,7 a cerca de 6,1. Em alguns aspectos, a formulação tem um pH de cerca de 5,8 a cerca de 6,0. Em alguns aspectos preferidos, a formulação tem um pH de cerca de 5,4 a cerca de 5,9. Em alguns aspectos, a formulação tem um pH de cerca de 5,6 a cerca de 5,9. Em alguns aspectos preferidos, a formulação tem um pH de cerca de 5,7 a cerca de 5,9. Em alguns aspectos preferidos, a formulação tem um pH de cerca de 5,9 a cerca de 6,1. Em alguns aspectos, a formulação tem um pH de cerca de 6,0 a cerca de 6,2. Em alguns aspectos, a formulação tem um pH de cerca de 5,7 a cerca de 6,0. Em alguns aspectos preferidos, a formulação tem um pH de cerca de 5,8 a cerca de 6,1. Esses intervalos incluem os valores inferiores e superiores que definem o intervalo. Em alguns aspectos, a formulação tem um pH de cerca de 5,8. Em alguns aspectos, a formulação tem um pH de cerca de 5,9. Em alguns aspectos, a formulação tem um pH de cerca de 6,0.

[00118] Em alguns aspectos preferidos, a formulação de anticorpo compreende de cerca de 20 mg/ml a cerca de 30 mg/ml de um anticorpo que se liga especificamente a VEGF e compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e um cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, um tampão que compreende de cerca de 30 mM a cerca de 70 mM de fosfato de citrato, de cerca de 150 mM a cerca de 170 mM de trealose, e de cerca de 0,01 % a cerca de 0,07 % (em volume) de polissorbato 20, e tem um pH de cerca de 5,6 a cerca de 6,0. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo consiste essencialmente em cerca de 20 mg/ml a cerca de 30 mg/ml de um anticorpo que se

liga especificamente a VEGF e compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, um tampão que compreende de cerca de 30 mM a cerca de 70 mM de fosfato de citrato, de cerca de 150 mM a cerca de 170 mM de trealose, e de um cerca de 0,01 % a cerca de 0,07 % (em volume) de polissorbato 20, e tem um pH de cerca de 5,6 a cerca de 6,0. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo consiste em cerca de 20 mg/ml a cerca de 30 mg/ml de um anticorpo que se liga especificamente a VEGF e compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, um tampão que compreende de cerca de 30 mM a cerca de 70 mM de fosfato de citrato, de cerca de 150 mM a cerca de 170 mM de trealose e de cerca de 0,01 % a cerca de 0,07 % (em volume) de polissorbato 20, e tem um pH de cerca de 5,6 a cerca de 6,0. Em qualquer uma dessas modalidades, o anticorpo pode estar presente na formulação de cerca de 21 mg/ml a cerca de 29 mg/ml, ou de cerca de 22 mg/ml a cerca de 28 mg/ml, ou de cerca de 23 mg/ml a cerca de 27 mg/ml, de cerca de 24 mg/ml a cerca de 26 mg/ml, ou de cerca de 24,5 mg/ml a cerca de 26,5 mg/ml, cerca de 25 mg/ml, cerca de 26 mg/ml, cerca de 25,5 mg/ml, cerca de 25,6 mg/ml, cerca de 25,7 mg/ml ou cerca de 25,8 mg/ml.

[00119] Em alguns aspectos preferidos, a formulação de anticorpo compreende de cerca de 20 mg/ml a cerca de 30 mg/ml de um anticorpo que se liga especificamente a VEGF e compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e um cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, um tampão que compreende de cerca de 40 mM a cerca de 60 mM de fosfato de citrato, de cerca de 154 mM a cerca de 164

mM de trealose e de cerca de 0,02 % a cerca de 0,06 % (em volume) de polissorbato 20, e tem um pH de cerca de 5,6 a cerca de 6,0, ou um pH de cerca de 5,8, ou um pH de cerca de 6,0. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo consiste essencialmente em cerca de 20 mg/ml a cerca de 30 mg/ml de um anticorpo que se liga especificamente a VEGF e compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, um tampão que compreende de cerca de 40 mM a cerca de 60 mM de fosfato de citrato, de cerca de 154 mM a cerca de 164 mM de trealose, e de cerca de 0,02 % a cerca de 0,06 % (em volume) de polissorbato 20, e tem um pH de cerca de 5,6 a cerca de 6,0, ou um pH de cerca de 5,8, ou um pH de cerca de 6,0. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo consiste em cerca de 20 mg/ml a cerca de 30 mg/ml de um anticorpo que se liga especificamente a VEGF e compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, um tampão que compreende de cerca de 40 mM a cerca de 60 mM de fosfato de citrato, de cerca de 154 mM a cerca de 164 mM de trealose, e de cerca de 0,02 % a cerca de 0,06 % (em volume) de polissorbato 20, e tem um pH de cerca de 5,6 a cerca de 6,0, ou um pH de cerca de 5,8, ou um pH de cerca de 6,0. Em qualquer uma dessas modalidades, o anticorpo pode estar presente na formulação de cerca de 21 mg/ml a cerca de 29 mg/ml, ou de cerca de 22 mg/ml a cerca de 28 mg/ml, ou de cerca de 23 mg/ml a cerca de 27 mg/ml, de cerca de 24 mg/ml a cerca de 26 mg/ml, ou de cerca de 24,5 mg/ml a cerca de 26,5 mg/ml, cerca de 25 mg/ml, cerca de 26 mg/ml, cerca de 25,5 mg/ml, cerca de 25,6 mg/ml, cerca de 25,7 mg/ml ou cerca de 25,8 mg/ml.

[00120] Em alguns aspectos preferidos, a formulação de anticorpo

compreende de cerca de 25 mg/ml a cerca de 26,5 mg/ml de um anticorpo que se liga especificamente a VEGF e compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, um tampão que compreende de cerca de 45 mM a cerca de 55 mM de fosfato de citrato, de cerca de 157 mM a cerca de 161 mM de trealose, e de cerca de 0,03 % a cerca de 0,05 % (em volume) de polissorbato 20, e tem um pH de cerca de 5,6 a cerca de 6,0, ou um pH de cerca de 5,8, ou um pH de cerca de 6,0. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo consiste essencialmente em cerca de 25 mg/ml a cerca de 26,5 mg/ml de um anticorpo que se liga especificamente a VEGF e compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, um tampão que compreende de cerca de 45 mM a cerca de 55 mM de fosfato de citrato, de cerca de 157 mM a cerca de 161 mM de trealose, e de cerca de 0,03 % a cerca de 0,05 % (em volume) de polissorbato 20, e tem um pH de cerca de 5,6 a cerca de 6,0, ou um pH de cerca de 5,8, ou um pH de cerca de 6,0. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo consiste em cerca de 25 mg/ml a cerca de 26,5 mg/ml de um anticorpo que se liga especificamente a VEGF e compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, um tampão que compreende de cerca de 45 mM a cerca de 55 mM de fosfato de citrato, de cerca de 157 mM a cerca de 161 mM de trealose, e de cerca de 0,03 % a cerca de 0,05 % (em volume) de polissorbato 20, e tem um pH de cerca de 5,6 a cerca de 6,0, ou um pH de cerca de 5,8, ou um pH de cerca de 6,0. Em qualquer uma dessas modalidades, o anticorpo pode estar presente na formulação de cerca de 25 mg/ml a cerca de 26 mg/ml, ou de cerca de

25 0,5 mg/ml a cerca de 26 mg/ml, cerca de 25 mg/ml, cerca de 26 mg/ml, cerca de 25,5 mg/ml, cerca de 25,6 mg/ml, cerca de 25,7 mg/ml ou cerca de 25,8 mg/ml.

[00121] Em alguns aspectos preferidos, a formulação de anticorpo compreende de cerca de 25,5 mg/ml a cerca de 26,1 mg/ml de um anticorpo que se liga especificamente a VEGF e compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, um tampão compreendendo cerca de 50 mM de fosfato de citrato, cerca de 159 mM de trealose e cerca de 0,04 % (em volume) de polissorbato 20 e tem um pH de cerca de 5,8 ou cerca de 6,0. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo consiste essencialmente em cerca de 25,5 mg/ml a cerca de 26,1 mg/ml de um anticorpo que se liga especificamente a VEGF e compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, um tampão compreendendo cerca de 50 mM de fosfato de citrato, cerca de 159 mM de trealose e cerca de 0,04 % (em volume) de polissorbato 20, e tem um pH de cerca de 5,8 ou cerca de 6,0. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo consiste em cerca de 25,5 mg/ml a cerca de 26,1 mg/ml de um anticorpo que se liga especificamente a VEGF e compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, um tampão que compreende cerca de 50 mM de fosfato de citrato, cerca de 159 mM de trealose e cerca de 0,04 % (em volume) de polissorbato 20, e tem um pH de cerca de 5,8 ou cerca de 6,0. Em qualquer uma dessas modalidades, o anticorpo pode estar presente na formulação em cerca de 26 mg/ml, cerca de 25,5 mg/ml, cerca de 25,6 mg/ml, cerca de 25,7 mg/ml ou cerca de 25,8 mg/ml.

[00122] A formulação estabiliza o anticorpo para melhor armazenamento em prateleira, particularmente por um período de meses a anos. Quando armazenado na formulação, o anticorpo mantém a estabilidade térmica e coloidal durante o período de armazenamento. Por exemplo, quando armazenado na formulação, o anticorpo é estável e exibe agregação, floculação, fragmentação e desnaturação mínimas, e o anticorpo retém sua atividade de ligação a VEGF.

[00123] É preferido que a formulação de anticorpo seja armazenada sob condições refrigeradas e, de preferência, a uma temperatura de cerca de 2 °C a cerca de 6 °C, incluindo cerca de 2 °C, cerca de 3 °C, cerca de 4 °C, cerca de 5 °C, cerca de 6 °C, cerca de 7 °C e cerca de 8 °C. A formulação do anticorpo pode ser armazenada a essas temperaturas durante pelo menos cerca de 3 meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo pode ser armazenada em tais temperaturas por pelo menos cerca de 6 meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo pode ser armazenada em tais temperaturas por pelo menos cerca de 9 meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo pode ser armazenada em tais temperaturas por pelo menos cerca de 12 meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo pode ser armazenada em tais temperaturas por pelo menos cerca de 15 meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo pode ser armazenada em tais temperaturas por pelo menos cerca de 18 meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo pode ser armazenada em tais temperaturas por pelo menos cerca de 21 meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo pode ser armazenada em tais temperaturas por pelo menos cerca de 24 meses. Durante o período de armazenamento, o anticorpo é estável e exibe agregação, floculação, fragmentação e desnaturação mínimas, e o anticorpo retém sua atividade de ligação a VEGF de modo que a formulação de anticorpo pode ser removida do armazenamento, administrada a um paciente e ainda exi-

bir eficácia terapêutica contra a condição para a qual a formulação é administrada.

[00124] A formulação compreende preferencialmente cerca de 20 mg/ml a cerca de 30 mg/ml de anticorpo e, mais preferencialmente cerca de 25 mg/ml ou cerca de 25,5 mg/ml, ou cerca de 26 mg/ml de anticorpo. Entre esta quantidade de proteína de anticorpo está uma porcentagem de monômeros de anticorpo na forma nativa ativa, bem como uma porcentagem de agregados de anticorpo que têm atividade de ligação a VEGF reduzida ou nenhuma. É altamente preferido que a formulação inclua uma quantidade máxima de monômeros de anticorpos funcionais e uma quantidade mínima de agregados de anticorpos, e formas estruturalmente alteradas do anticorpo com atividade de ligação reduzida e/ou eficácia terapêutica (em relação ao monômero inalterado). Por exemplo, a formulação de anticorpo contém preferencialmente pelo menos cerca de 85 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 15 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado a cerca de 2 °C a cerca de 6 °C por pelo menos cerca de seis meses.

[00125] Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 90 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 10 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C durante pelo menos cerca de seis meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 93 % em peso de monômeros de anticorpo e menos do que cerca de 7 % em peso de agregados de anticorpos com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenados a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C por pelo menos cerca de seis meses. Em alguns aspectos, a formulação de an-

anticorpo contém pelo menos cerca de 95 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 5 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C por pelo menos cerca de seis meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 96 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenada a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C por pelo menos cerca de seis meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 97 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 3 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C por pelo menos cerca de seis meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 98 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 2 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado de cerca de 2 °C a cerca de 8 °C por pelo menos cerca de seis meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 99 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 1 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C por pelo menos cerca de seis meses. A quantidade de monômeros de anticorpo e/ou agregados de anticorpo pode ser determinada de acordo com qualquer técnica adequada na técnica, incluindo aquelas descritas ou exemplificadas aqui, incluindo qualquer uma ou combinação de dispersão de luz diferencial (DLS), calorimetria de varredura diferencial (DSC), cromatografia de exclusão por tamanho (SE-HPLC), eletroforese capilar não redutora e redutora SDS (NR CE-SDS e R CE-SDS) e contagem

de partículas (PC).

[00126] Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 90 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 10 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C durante pelo menos cerca de doze meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 93 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 7 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C por pelo menos cerca de doze meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 95 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 5 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C por pelo menos cerca de doze meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 96 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenada a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C por pelo menos cerca de doze meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 97 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 3 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C por pelo menos cerca de doze meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 98 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 2 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado de cerca de 2 °C a cerca de 8 °C por pelo menos

cerca de doze meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 99 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 1 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C por pelo menos cerca de doze meses. A quantidade de monômeros de anticorpo e/ou agregados de anticorpo pode ser determinada de acordo com qualquer técnica adequada na técnica, incluindo aquelas descritas ou exemplificadas aqui, incluindo qualquer uma ou combinação de dispersão de luz diferencial (DLS), calorimetria de varredura diferencial (DSC), cromatografia de exclusão por tamanho (SE-HPLC), eletroforese capilar não redutora e redutora SDS (NR CE-SDS e R CE-SDS) e contagem de partículas (PC).

[00127] Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 90 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 10 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C durante pelo menos cerca de dezoito meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 93 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 7 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C durante pelo menos cerca de dezoito meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 95 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 5 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C por pelo menos cerca de dezoito meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 96 % em peso de agregados

de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenada a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C por pelo menos cerca de dezoito meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 97 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 3 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C por pelo menos cerca de dezoito meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 98 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 2 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado de cerca de 2 °C a cerca de 8 °C por pelo menos cerca de dezoito meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 99 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 1 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C por pelo menos cerca de dezoito meses. A quantidade de monômeros de anticorpo e/ou agregados de anticorpo pode ser determinada de acordo com qualquer técnica adequada na técnica, incluindo aquelas descritas ou exemplificadas aqui, incluindo qualquer uma ou combinação de dispersão de luz diferencial (DLS), calorimetria de varredura diferencial (DSC), cromatografia de exclusão por tamanho (SE-HPLC), eletroforese capilar não redutora e redutora SDS (NR CE-SDS e R CE-SDS) e contagem de partículas (PC).

[00128] Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 90 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 10 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C durante pelo menos cer-

ca de vinte e quatro meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 93 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 7 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C por pelo menos cerca de vinte e quatro meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 95 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 5 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C por pelo menos cerca de vinte e quatro meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 96 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenada a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C por pelo menos cerca de vinte e quatro meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 97 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 3 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C por pelo menos cerca de vinte e quatro meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 98 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 2 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado de cerca de 2 °C a cerca de 8 °C por pelo menos cerca de vinte e quatro meses. Em alguns aspectos, a formulação de anticorpo contém pelo menos cerca de 99 % em peso de monômeros de anticorpo e menos de cerca de 1 % em peso de agregados de anticorpo com atividade de ligação a VEGF reduzida e/ou eficácia terapêutica quando armazenado a cerca de 2 °C a cerca de 8 °C por pelo menos cerca de vinte e quatro me-

ses. A quantidade de monômeros de anticorpo e/ou agregados de anticorpo pode ser determinada de acordo com qualquer técnica adequada na técnica, incluindo aquelas descritas ou exemplificadas aqui, incluindo qualquer uma ou combinação de dispersão de luz diferencial (DLS), calorimetria de varredura diferencial (DSC), cromatografia de exclusão por tamanho (SE-HPLC), eletroforese capilar não redutora e redutora SDS (NR CE-SDS e R CE-SDS) e contagem de partículas (PC).

Métodos de Produção de Composições de Anticorpos Estáveis

[00129] Os métodos da descrição produzem composições de anticorpos estáveis. Estas composições de anticorpos estáveis podem ser referidas como ONS-5010. Em algumas modalidades, ONS-5010 compreende um anticorpo biossimilar, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, α,α' -trealose e polissorbato 20. Em algumas modalidades, as composições de anticorpo estáveis contêm quantidades mínimas de HMWS, acumulam HMWS em uma taxa mais lenta ao longo do tempo e/ou manter baixas quantidades de HMWS durante armazenamento de longo prazo (por exemplo, em comparação com outras composições de anticorpos).

[00130] Geralmente, a HMWS contribui para a formação de agregados covalentes não reversíveis que diminuem a ligação de um anticorpo, por exemplo, bevacizumabe, ao seu epítipo no VEGF, reduzindo assim a eficácia terapêutica do anticorpo. Normalmente, limitar a quantidade de HMWS reduz este problema e aumenta a atividade do anticorpo. Além disso, os padrões regulatórios limitam a quantidade permitida de HMWS em formulações de anticorpos de bevacizumabe a menos ou igual a 8 % após vinte e quatro meses. Portanto, é desejável limitar a quantidade de HMWS em composições de anticorpos estáveis, para retardar o acúmulo de HMWS ao longo do tempo e manter baixas quantidades de HMWS durante o armazenamento de longo

prazo.

[00131] Em algumas modalidades, a diafiltração é um componente da penúltima etapa no processo de fabricação da composição de anticorpo estável (por exemplo, anticorpo biossimilar) da presente descrição. Geralmente, os valores de pH iguais ou acima de 6,2 durante a diafiltração aumentam a HMWS em formulações de anticorpo, por exemplo, bevacizumabe, causando maior acúmulo de HMWS ao longo do tempo. Consequentemente, a presente descrição fornece métodos de diafiltração que diminuem HMWS por diafiltração de uma composição concentrada em uma solução de permuta compreendendo trealose e, após a diafiltração, ajustando rapidamente o pH da composição por adição de uma composição de fosfato. Em algumas modalidades, a adição da composição de fosfato evita a geração e o acúmulo de HMWS durante a fabricação e armazenamento das composições de anticorpos estáveis.

[00132] A presente descrição fornece um método de produção de uma composição de anticorpo estável. O método inclui ultrafiltrar uma composição inicial para produzir uma composição concentrada. Em alguns aspectos, a composição inicial compreende entre ou entre cerca de 4 mg/ml e 6 mg/ml, inclusive dos pontos finais, de um anticorpo. Em alguns aspectos, a composição inicial tem um pH de cerca de 4,7 a cerca de 5,3, incluindo os pontos finais. Em certos aspectos, o pH da composição inicial é de cerca de 5,0.

[00133] Em alguns aspectos, os métodos da descrição produzem uma composição de anticorpo estável que compreende a ultrafiltração de uma composição de partida. Em alguns aspectos, os métodos da descrição empregam uma composição inicial compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um anticorpo e uma composição tampão inicial. Em algumas modalidades, a composição de partida compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em en-

tre ou entre cerca de 4 mg/ml e 6 mg/ml de um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma luz cadeia que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

[00134] Em alguns aspectos, a composição tampão de partida tem um pH de cerca de 5,0. Uma composição tampão de partida exemplar da descrição inclui, mas não está limitada a, acetato. Em alguns aspectos, a composição do tampão inicial tem uma condutividade entre ou entre cerca de 20 e 30 mS/cm, tal como cerca de 25 mS/cm. Em alguns aspectos, a composição do tampão de partida tem uma condutividade de 25 mS/cm. Em algumas modalidades de aspectos, a composição tampão de partida compreende um ou mais íons de metal monovalentes ou bivalentes em uma concentração que não diminui a estabilidade do anticorpo em comparação com uma composição que não compreende um ou mais íons de metal monovalentes ou bivalentes. Os íons metálicos monovalentes ou bivalentes (ou divalentes) exemplares incluem, mas não estão limitados a, hidrogênio (H), lítio (Li), sódio (Na), magnésio (Mg), potássio (K), cálcio (Ca), manganês (Mn), ferro (Fe), cobalto (Co) e zinco (Zn).

[00135] Em alguns aspectos, os métodos da descrição podem ser referidos como ultrafiltração/diafiltração (UF/DF). Geralmente, o tamanho da membrana, o material e a carga podem afetar a adsorção ou retenção de proteínas durante a UF/DF. Em alguns aspectos, os métodos da descrição usam membranas de polietersulfona. Em alguns aspectos, os métodos da descrição usam membranas com um tamanho de poro de peso molecular de 30 kD. A carga da membrana, que geralmente é um fator do tempo de processo desejado e do fluxo de permeado (volume de permeado ao longo do tempo), pode afetar a qualidade do produto obtido do UF/DF. O fluxo de permeado é tipicamente influenciado pela taxa de alimentação (LMH), pressão de reten-

tado/pressão de transmembrana e a viscosidade do material. Em algumas modalidades, a membrana suporta uma carga de $\leq 1000 \text{ g/m}^2$, $\leq 750 \text{ g/m}^2$, $\leq 500 \text{ g/m}^2$ ou $\leq 250 \text{ g/m}^2$. Em algumas modalidades, a membrana suporta uma carga de $\leq$ cerca de 500 g/m^2 a $\leq$ cerca de 100 g/m^2 . Em algumas modalidades, a membrana suporta uma carga de $\leq$ cerca de 300 g/m^2 . Em alguns aspectos, taxas de fluxo de alimentação de $\leq 450 \text{ LMH}$ são usadas nos métodos da descrição. Em alguns aspectos, uma taxa de fluxo de alimentação de 375 LMH é usada nos métodos da descrição. Em alguns aspectos, uma pressão de retentado de $\leq 1,76 \text{ kg/cm}^2$ (25 psi) é usada nos métodos da descrição. Em alguns aspectos, uma pressão de retentado de $0,35 \text{ kg/cm}^2$ (5 psi) é usada nos métodos da descrição. Em alguns aspectos, um TMP de $\leq 20 \text{ psig}$ é usado em os métodos de descrição. Em alguns aspectos, um TMP de 15 psig é usado nos métodos da descrição.

[00136] Em alguns aspectos, as composições da descrição (por exemplo, a composição inicial, a composição concentrada, a composição de trealose) podem ser ultrafiltradas antes da diafiltração. Em alguns aspectos, as composições da descrição podem ser concentradas por ultrafiltração antes da diafiltração. Em alguns aspectos, a ultrafiltração produz uma composição concentrada compreendendo entre ou entre cerca de 30 e 40 mg/ml, incluindo os pontos finais, do anticorpo.

[00137] A diafiltração pode ser usada para remover ou diminuir a concentração de sais ou solventes em composições ou formulações da presente descrição. A diafiltração pode ser contínua ou descontínua. Membranas de celulose regenerada ou membranas de polieter-sulfona podem ser utilizadas para diafiltração. Geralmente, essas membranas, ou cassetes, têm uma ampla faixa de pH e temperatura. As membranas usadas para diafiltração estão normalmente disponíveis em uma variedade de pontos de corte de peso molecular, incluindo 1 kDa, 30 kD e 100 kD. Em alguns aspectos, os métodos da descri-

ção empregam membranas com um tamanho de poro de peso molecular de 30 kD. Estas membranas podem ser equilibradas antes da diafiltração. Em alguns aspectos, as membranas são equilibradas com acetato de sódio. Em alguns aspectos, cerca de 25 mM de acetato de sódio é usado para equilibrar as membranas. Em alguns aspectos, as membranas são equilibradas com cloreto de sódio. Em alguns aspectos, cerca de 240 mM de cloreto de sódio é usado para equilibrar as membranas. Em alguns aspectos, 237 mM de cloreto de sódio são usados. Em alguns aspectos, as membranas são equilibradas com uma solução de trealose. Em alguns aspectos, a solução de trealose compreende cerca de 6 % de trealose. Em alguns aspectos, a solução de trealose compreende trealose em água. As membranas também podem ser equilibradas a um pH e condutividade desejados. Em alguns aspectos, as membranas são equilibradas a um pH entre ou entre cerca de 4,5 e 5,5, tal como cerca de 5,0. Em alguns aspectos, as membranas são equilibradas com uma condutividade entre ou entre cerca de 20 e 30 mS/cm, tal como cerca de 25 mS/cm.

[00138] Em alguns aspectos, a diafiltração compreende a permuta da composição do tampão inicial da composição concentrada por uma solução de permuta. Em algumas modalidades, a solução de permuta pode ser aquosa. Em alguns aspectos, a solução de permuta compreende trealose. Em algumas modalidades, a solução de permuta compreende de cerca de 4 % a cerca de 8 % de trealose (p/v), incluindo os pontos finais. Em certos aspectos, a solução de permuta compreende 6 % de trealose (p/v) em água. Em alguns aspectos, a trealose é α,α' -trealose. Em alguns aspectos, a solução de permuta compreende polissorbato, incluindo, como um exemplo não limitante, polissorbato 20. Em alguns aspectos, uma composição de polissorbato compreendendo cerca de 10 % de polissorbato é usada para produzir uma concentração final de cerca de 0,03 % a cerca de 0,05 % de polissorbato 20 na

composição de permuta e/ou na composição de trealose. Em alguns aspectos, a solução de permuta e/ou composição de trealose compreende uma concentração final de polissorbato de 0,04 %. Em alguns aspectos, ≥ 5 diavolumes da solução de permuta podem ser usados durante a diafiltração. Como um exemplo não limitante, a quantidade da solução de permuta usada pode ser 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ou 8,0 diavolumes.

[00139] Em alguns aspectos, a composição de trealose compreende entre ou entre cerca de 30 g/L e 40 g/L, incluindo os pontos finais, do anticorpo. Em alguns aspectos, a composição de trealose compreende cerca de 35 g/L do anticorpo. Em algumas modalidades, a composição de trealose compreende 35 g/L do anticorpo.

[00140] Em alguns aspectos, a composição de trealose tem um pH de cerca de 4,7 a cerca de 5,3, incluindo os pontos finais. Em certos aspectos, o pH da composição de trealose é de cerca de 5,0.

[00141] Etapas adicionais do processo podem ser empregadas para aumentar a recuperação ou melhorar a qualidade dos produtos de UF/DF. Por exemplo, a perda de produto pode resultar da perda no permeado devido ao produto que passou através da membrana, ligado à membrana e não pode ser dessorvido antes da recuperação, ou produto que de outra forma é perdido no sistema. Os procedimentos de recuperação podem usar ar, tampão ou auxílio da gravidade. Como um exemplo não limitante, a recirculação do tampão pode ser usada para concentrar o produto e melhorar a recuperação. Os métodos de recirculação do tampão também podem ser usados para despolarizar as membranas e melhorar a mistura do produto. Em algumas modalidades, uma pressão de recirculação de ≤ 30 psig é usada. Em algumas modalidades, o tempo de recirculação pode ser ≤ 60 minutos. Em algumas modalidades, o tempo de recirculação é de cerca de 10 minutos. Um enxágue de fluxo em tampão ou *chase* pode ser usado para

recuperar o produto que é perdido no equipamento ou sistema. Este procedimento pode ser usado para liberar o produto (proteína, por exemplo, anticorpo) do sistema. Em alguns aspectos, o volume de 6 % α,α -trealose usado no enxágue de fluxo em tampão ou *chase* pode ser selecionado para produzir uma concentração de proteína de cerca de 30 g/L. Em alguns aspectos, o volume usado no enxágue de fluxo em tampão ou *chase* pode ser selecionado para produzir uma concentração de proteína de cerca de 28,5 a cerca de 31,5 g/L, incluindo os pontos finais.

[00142] Em algumas modalidades, o método da presente descrição também inclui o contato da composição de trealose com uma composição de fosfato para produzir uma composição de pH ajustado.

[00143] Em alguns aspectos, a etapa de contato tem uma duração de entre ou entre cerca de 1 segundo e 3600 segundos, incluindo os terminais. Em alguns aspectos, a etapa de contato tem uma duração de entre ou entre cerca de 1500 e 2100 segundos, incluindo os terminais. Em alguns aspectos, a etapa de contato tem uma duração de cerca de 1800 segundos. Métodos conhecidos na técnica podem ser usados para aumentar a taxa à qual ocorre o contato. Métodos exemplares podem incluir, mas não estão limitados a, a aplicação de calor, pressão ou agitação à composição de trealose. Em algumas modalidades, calor, pressão ou agitação podem ser aplicados à composição de fosfato.

[00144] Em alguns aspectos, a composição de fosfato tem um pH de cerca de 5,5 a cerca de 5,9, incluindo os pontos finais. Em certos aspectos, a composição de fosfato tem um pH de cerca de 5,7. Em alguns desses aspectos, a composição de fosfato tem um pH de 5,74.

[00145] Em algumas modalidades, a composição de fosfato da presente descrição compreende fosfato de sódio. Em alguns aspectos, a composição de fosfato compreende entre ou entre cerca de 450 mM e

550 mM, incluindo os pontos finais, fosfato de sódio. Em alguns aspectos, a composição de fosfato compreende cerca de 500 mM de fosfato de sódio. Em alguns de tais aspectos, a composição de fosfato compreende 510 mM.

[00146] Em alguns aspectos, o fosfato de sódio é fosfato de sódio monobásico. Em alguns aspectos, o fosfato de sódio é fosfato de sódio dibásico. Em algumas modalidades, o fosfato de sódio compreende fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico. Em alguns aspectos, a composição de fosfato compreende entre ou entre cerca de 50 e 60 g/L, incluindo os pontos finais, de fosfato de sódio monobásico. Em alguns aspectos, a composição de fosfato compreende cerca de 55 g/L de fosfato de sódio monobásico. Em algumas modalidades, a composição de fosfato compreende 58 g/L de fosfato de sódio monobásico. Em alguns aspectos, a composição de fosfato compreende entre ou entre cerca de 10 e 20 g/L, incluindo os pontos finais, de fosfato de sódio dibásico. Em alguns aspectos, a composição de fosfato compreende cerca de 15 g/L de fosfato de sódio dibásico. Em algumas modalidades, a composição de fosfato compreende 12 g/L de fosfato de sódio dibásico.

[00147] Em alguns aspectos, a composição de fosfato compreende entre ou entre cerca de 40 e 80 g/L de α,α' -trealose, tal como entre ou entre cerca de 50 e 70 g/L de α,α' -trealose. Em alguns aspectos, a composição de fosfato compreende cerca de 60 g/L de α,α' -trealose.

[00148] Em alguns aspectos, a concentração final de fosfato de sódio na composição com pH ajustado está entre cerca de 40 mM e cerca de 60 mM, incluindo os pontos finais. Em alguns aspectos, a concentração final do fosfato de sódio na composição com pH ajustado está entre 45 mM e 55 mM, incluindo os pontos finais. Em alguns aspectos, a concentração final do fosfato de sódio na composição com pH ajustado é de cerca de 50 mM. Em alguns aspectos, a concentra-

ção final do fosfato de sódio na composição de pH ajustado é ou é cerca de 51 mM.

[00149] Em alguns aspectos, o pH da composição com pH ajustado está entre cerca de 5,9 e cerca de 6,3, incluindo os pontos finais. Em alguns aspectos, o pH da composição com pH ajustado está entre 5,9 e 6,3, incluindo os pontos finais. Em alguns aspectos, o pH da composição com pH ajustado é ou é cerca de 6,2.

[00150] Em algumas modalidades, o método da presente descrição inclui a formulação da composição de pH ajustado para entrega a um indivíduo para produzir uma composição de anticorpo estável. Em alguns aspectos, a etapa de formulação compreende a adição de solução aquosa (solução de fosfato e/ou polissorbato). Em alguns aspectos, a etapa de formulação compreende a adição de um tensoativo não iônico (polissorbato 20).

[00151] Em alguns aspectos, a composição de pH ajustado compreende cerca de 3,0 a cerca de 3,5 % de HMWS, incluindo os pontos finais. Em alguns aspectos, a composição de pH ajustado compreende cerca de 3,20, cerca de 3,25, cerca de 3,30, cerca de 3,35, cerca de 3,40, cerca de 3,45 ou cerca de 3,50 % de HMWS. Em alguns aspectos, a composição com pH ajustado compreende 3,20, 3,25, 3,30, 3,35, 3,40, 3,45 ou 3,50 % de HMWS.

[00152] Em algumas modalidades, o método da presente descrição inclui a formulação da composição de pH ajustado para entrega a um indivíduo para produzir uma composição de anticorpo estável. Em alguns aspectos, a formulação compreende o contato da composição de pH ajustado com uma composição de polissorbato.

[00153] Em alguns aspectos, a composição de polissorbato compreende polissorbato 20.

[00154] Em alguns aspectos, a composição de polissorbato compreende cerca de 10 % de polissorbato. Em algumas modalidades, a

composição de polissorbato é usada para produzir uma concentração final de cerca de 0,03 % a cerca de 0,05 % de polissorbato 20 na composição de anticorpo estável. Em alguns aspectos, a composição de anticorpo estável compreende uma concentração final de polissorbato de 0,04 %.

[00155] Em alguns aspectos, a presente descrição fornece uma composição de anticorpo estável compreendendo 25 g/L de um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 5,8 g/L de mono-hidrato monobásico de fosfato de sódio, 1,2 g/L de fosfato de sódio dibásico anidro, 60,0 g/L de desidrato de α,α' -trealose e 0,04% (v/v) de polissorbato 20. Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável compreende $\leq 6\%$ de HMWS.

[00156] Em alguns aspectos, a composição de anticorpo estável tem uma concentração final de anticorpo entre ou entre cerca de 22,5 g/L e 27,5 g/L, incluindo os pontos finais. Em certos aspectos, a composição de anticorpo estável tem uma concentração final de cerca de 25 g/L do anticorpo. Em certos aspectos, a composição de anticorpo estável tem uma concentração final de cerca de 0,04% de polissorbato 20. Em certos aspectos, a composição de anticorpo estável tem uma concentração final de 0,04% de polissorbato 20. Em algumas modalidades, entre o anticorpo compreendido pela composição de anticorpo estável está uma porcentagem de monômeros de anticorpo na forma nativa, ativa, bem como uma porcentagem de fragmentos de anticorpos, agregados de anticorpos e anticorpos desnaturados ou parcialmente desnaturados que têm reduzida ou nenhuma atividade de ligação à necrose tumoral. Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável inclui uma quantidade máxima de monômeros de anticorpo funcionais e uma quantidade mínima de fragmentos de anticor-

po, agregados e formas estruturalmente alteradas do anticorpo com atividade de ligação reduzida e/ou eficácia terapêutica (em relação ao monômero inalterado).

[00157] Em alguns aspectos, a composição de anticorpo estável compreende cerca de 3,0 a cerca de 6,0% de HMWS, incluindo os pontos finais. Em alguns aspectos, a composição de anticorpo estável compreende cerca de 3,20, cerca de 3,25, cerca de 3,30, cerca de 3,35, cerca de 3,40, cerca de 3,45, cerca de 3,50, cerca de 4,00, cerca de 4,50 ou cerca de 6,00% de HMWS.

[00158] Em alguns aspectos, a composição de anticorpo estável se acumula entre 0,25% e 0,50%, inclusive dos pontos finais, de HMWS por mês após a etapa de formulação. Em alguns aspectos, a composição de anticorpo estável mantém $\leq 15\%$, $\leq 12\%$, $\leq 10\%$, $\leq 8\%$, $\leq 7\%$, $\leq 6\%$ ou $\leq 5\%$ de HMWS por pelo menos doze, pelo menos dezesseis, pelo menos dezoito, pelo menos vinte e quatro, pelo menos trinta ou pelo menos trinta e seis meses. Em alguns aspectos, a composição de anticorpo estável compreende $\leq 8\%$ de HMWS mais de vinte e quatro meses após a conclusão da etapa de formulação.

[00159] Em alguns aspectos, a composição de anticorpo estável compreende entre 0,5% e 2,5%, inclusive dos pontos finais, oxidação de resíduos de metionina da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 ou a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Em alguns aspectos, a composição de anticorpo estável compreende $\leq 2,5\%$ de oxidação de resíduos de metionina da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 ou a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Em alguns aspectos, a oxidação de resíduos de metionina da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 compreende a oxidação da metionina na posição 258 da SEQ ID NO: 1.

[00160] Em alguns aspectos, a composição de anticorpo estável tem um pH de cerca de 5,9 a cerca de 6,3, inclusive dos pontos finais.

Em certos aspectos, a composição de anticorpo estável tem um pH de cerca de 6,1. Em algumas modalidades, a composição de anticorpo estável tem um pH de 6,1.

[00161] Em alguns aspectos, a composição de anticorpo estável é armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ dentro de 60 dias após a conclusão da etapa de formulação ou após uma data de fabricação da composição de anticorpo estável. A composição de anticorpo estável pode ser armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ dentro de 30 dias após a conclusão da etapa de formulação ou após uma data de fabricação da composição de anticorpo estável. A composição de anticorpo estável pode ser armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ dentro de 15 dias após a conclusão da etapa de formulação ou após uma data de fabricação da composição de anticorpo estável. Em algumas modalidades, as composições da descrição, por exemplo, a composição de anticorpo estável, podem ser armazenadas a tais temperaturas por pelo menos cerca de 3 meses, pelo menos cerca de 6 meses, pelo menos cerca de 9 meses, pelo menos cerca de 12 meses, pelo menos cerca de 15 meses, pelo menos cerca de 18 meses, pelo menos cerca de 21 meses, pelo menos cerca de 24 meses ou qualquer número mínimo de meses entre eles. Em algumas modalidades, durante o período de armazenamento, o anticorpo é estável e exibe acúmulo mínimo de HMWS, de modo que a composição de anticorpo estável pode ser removida do armazenamento, administrada a um paciente e ainda exibir eficácia terapêutica contra a condição para a qual a composição de anticorpo estável é administrada.

Métodos de Tratamento

[00162] Em algumas modalidades, as composições e formulações da presente descrição compreendem uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz pode variar, dependendo da doença ou condição a ser tratada após a admi-

nistração do anticorpo e/ou dependendo das características do indivíduo ao qual o anticorpo é administrado, tais como idade, sexo, altura, peso, estado de avanço ou estágio da doença ou condição, o número e eficácia de administrações anteriores, outros agentes terapêuticos administrados ao indivíduo e outras características que são conhecidas pelo médico ou que de outra forma seriam levadas em consideração na determinação da dosagem apropriada. Normalmente, uma quantidade terapeuticamente eficaz é uma quantidade que é eficaz para tratar cânceres, como câncer de pulmão não escamoso de células não pequenas, glioblastoma, carcinoma de células renais, câncer cervical ou ovariano epitelial, trompa de Falópio ou câncer peritoneal primário. Em alguns aspectos, as composições da presente descrição podem ser usadas para tratar câncer de cólon, câncer de pulmão, glioblastoma, câncer retal, tumores cerebrais e carcinoma de células renais.

[00163] Em alguns aspectos, as composições da presente descrição podem ser usadas para tratar condições ou distúrbios oculares, incluindo, porém, não se limitando àqueles da retina, esclera, vítreo, cristalino, pupila, íris, córnea, coroide, nervo ótico, vasculatura retiniana, corpo ciliar ou ângulo do olho. Em algumas modalidades, o ângulo do olho compreende a malha trabecular e estruturas associadas. Em alguns aspectos, as composições da presente descrição podem ser usadas para tratar condições ou distúrbios oculares em que o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é super-regulado, desregulado ou hiperativo. Em alguns aspectos, as composições da presente descrição podem ser usadas para tratar condições ou distúrbios oculares, incluindo, porém, não se limitando a, degeneração macular relacionada à idade, edema macular, edema macular diabético (DME), retinopatia, retinopatia diabética, degeneração miópica, neovascularização coroidal idiopática, neovascularização coroidal inflamatória, neovascularização retiniana, vasculopatia coroidal poliploide, neovascularização

ocular, oclusão da veia retiniana do ramo (BRVO), oclusão da veia retiniana central, coriorretinopatia serosa central, retinite, retinite pigmentosa, doença de Sargardt, síndrome de usher, degeneração retiniana, endoftalmite, vitreorretinopatia exsudativa familiar, telangiectasia justafoveal idiopática, degeneração em treliça, buraco macular, vasculatura fetal persistente, oclusão da artéria retiniana e retinoblastoma. Em alguns aspectos, as composições da presente descrição podem ser usadas para tratar condições ou distúrbios oculares, incluindo, porém, não se limitando a, degeneração macular relacionada à idade, degeneração macular relacionada à idade úmida e degeneração macular relacionada à idade neovascular.

[00164] Em alguns aspectos, os métodos de tratamento da degeneração macular relacionada à idade úmida com composições de anticorpos estáveis da descrição compreendem a inibição, prevenção ou redução do crescimento vascular no olho. Em alguns aspectos, os métodos de tratamento da degeneração macular relacionada à idade úmida com composições de anticorpos estáveis da descrição compreendem a inibição, prevenção ou redução da vascularização do olho.

[00165] As composições de anticorpos estáveis da descrição podem ser administradas por qualquer rotina apropriada, incluindo, porém, não se limitando a, rotinas orais, rotinas intravenosas, rotinas intramusculares, topicamente, subcutaneamente, supracoroidalmente, via colírio e absorção direta através dos tecidos da membrana mucosa. Em alguns aspectos, as composições de anticorpos estáveis da descrição podem ser administradas como uma solução para infusão intravenosa. Em alguns aspectos, as composições de anticorpos estáveis da descrição podem ser administradas como uma injeção intravítrea. Em alguns aspectos, as composições de anticorpos estáveis da descrição podem ser administradas como uma infusão intravítrea.

[00166] Em alguns aspectos, as composições de anticorpos está-

veis da descrição podem ser administradas a cada 2 semanas. Em alguns aspectos, as composições de anticorpos estáveis da descrição podem ser administradas a cada 15 dias. Em alguns aspectos, as composições de anticorpos estáveis da descrição podem ser administradas duas vezes por mês. É possível que limitar o % de HMWS nas composições de um anticorpo reduziria a frequência de administração da dose necessária para atingir a eficácia terapêutica. Os métodos da descrição podem produzir composições que são administradas a cada 15-30 dias. Os métodos da descrição podem produzir composições que são administradas a cada 20 dias. Os métodos da descrição podem produzir composições que são administradas a cada três, quatro, cinco ou seis semanas. Os métodos da descrição podem produzir composições que são administradas uma vez por mês ou uma vez a cada dois meses. Em alguns aspectos, as composições de anticorpos estáveis da descrição podem ser administradas por 52 semanas. Em alguns aspectos, as composições de anticorpos estáveis da descrição podem ser administradas por cerca de 50 semanas. Em alguns aspectos, as composições de anticorpos estáveis da descrição podem ser administradas por 4 semanas, 8 semanas, 16 semanas, 24 semanas, 36 semanas ou 48 semanas. Em alguns aspectos, as composições de anticorpos estáveis podem ser administradas quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 12, 14, 16, 18, 20 ou 25 vezes. É possível que limitar a quantidade do % de HMWS em composições de anticorpos estáveis reduziria a quantidade, duração ou frequência de administração da dose necessária para atingir a eficácia terapêutica.

[00167] Em alguns aspectos, as composições de anticorpos estáveis da descrição têm uma meia-vida aproximada de 11-50 dias. Em alguns aspectos, as composições de anticorpos estáveis da descrição têm uma meia-vida aproximada de 20 dias. É possível que limitar a quantidade do % de HMWS em composições de anticorpos estáveis

aumentaria sua meia-vida. Os métodos da descrição podem produzir composições com meia-vida de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 ou mais dias a mais do que as composições de anticorpos produzidas por métodos convencionais.

[00168] As composições adequadas podem conter isoformas de anticorpos ou combinações das mesmas, juntamente com um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis e/ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

[00169] A invenção também apresenta métodos para o tratamento de um tumor em um indivíduo em necessidade dos mesmos, administrando uma quantidade terapeuticamente eficaz de qualquer uma das formulações de anticorpo aqui descritas ou exemplificadas. Preferivelmente, as formulações de anticorpos são usadas em métodos para o tratamento de cânceres, como ovariano epitelial recorrente resistente à platina, trompa de Falópio ou câncer peritoneal primário, câncer cervical persistente, recorrente ou metastático, câncer colorretal metastático, câncer de mama de HER2 negativo metastático, carcinoma de células renais metastático, glioblastoma ou câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC). A eficácia terapêutica é alcançada, por exemplo, pelo anticorpo bevacizumabe presente na formulação administrada. A administração da formulação do anticorpo pode ser de acordo com qualquer rotina adequada, preferivelmente por injeção, e mais preferivelmente por injeção intravenosa. A administração pode ser realizada sob a direção ou supervisão de um médico.

[00170] A invenção também apresenta métodos para o tratamento de uma condição ou distúrbio ocular em um indivíduo em necessidade dos mesmos, administrando uma quantidade terapeuticamente eficaz de qualquer uma das formulações de anticorpo descritas ou exemplificadas aqui. Preferivelmente, as formulações de anticorpos são usadas em métodos para o tratamento de condições ou distúrbios oculares,

incluindo, porém, não se limitando aos da retina, esclera, vítreo, cristalino, pupila, íris, córnea, coróide, nervo ótico, vasculatura retiniana, corpo ciliar, ou ângulo do olho (incluindo a malha trabecular e estruturas associadas). Em alguns aspectos, as composições da presente descrição podem ser usadas para tratar condições ou distúrbios oculares em que o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é super-regulado, desregulado ou hiperativo. Em alguns aspectos, as composições da presente descrição podem ser usadas para tratar condições ou distúrbios oculares, incluindo, porém, não se limitando a, degeneração macular relacionada à idade, edema macular, edema macular diabético (DME), retinopatia, retinopatia diabética, degeneração miópica, neovascularização coroidal idiopática, neovascularização coroidal inflamatória, neovascularização retiniana, vasculopatia coroidal poliploide, neovascularização do olho, oclusão da veia retiniana do ramo (BRVO), oclusão da veia retiniana central, coriorretinopatia serosa central, retinite, retinite pigmentosa, doença de Stargardt, síndrome de Usher, degeneração retiniana, endoftalmite, vitreorretinopatia exsudativa familiar, telangiectasia justafoveal idiopática, degeneração em treliça, buraco macular, vasculatura fetal persistente, oclusão da artéria retiniana e retinoblastoma. Em alguns aspectos, as composições da presente descrição podem ser usadas para tratar condições ou distúrbios oculares, incluindo, porém, não se limitando a, degeneração macular relacionada à idade, degeneração macular relacionada à idade úmida e degeneração macular relacionada à idade neovascular.

[00171] As formulações de anticorpos descritas e exemplificadas neste documento podem ser para uso como um medicamento. As formulações de anticorpos aqui descritas e exemplificadas podem ser para uso na fabricação de um medicamento para o tratamento de um ou mais de um câncer, como o ovariano epitelial recorrente resistente à platina, trompa de Falópio ou câncer peritoneal primário, persistente,

recorrente ou câncer cervical metastático, câncer colorretal metastático, câncer de mama de HER2 negativo metastático, carcinoma de células renais metastático, glioblastoma ou câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC). As formulações podem ser para uso no tratamento de câncer ovariano epitelial recorrente resistente à platina, trompa de Falópio ou peritoneal primário. As formulações podem ser para uso no tratamento de câncer cervical persistente, recorrente ou metastático. As formulações podem ser para uso no tratamento de câncer colorretal metastático. As formulações podem ser para uso no tratamento de câncer de mama de HER2 negativo metastático. As formulações podem ser para uso no tratamento de carcinoma de células renais metastático. As formulações podem ser para uso no tratamento de glioblastoma. As formulações podem ser para uso no tratamento de câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC). As formulações de anticorpos aqui descritas e exemplificadas podem ser para uso na fabricação de um medicamento para o tratamento de um ou mais dentre uma condição ou distúrbio ocular, incluindo, porém, não se limitando àqueles da retina, esclera, vítreo, cristalino, pupila, íris, córnea, coróide, nervo ótico, vasculatura retiniana, corpo ciliar ou ângulo do olho (incluindo a rede trabecular e estruturas associadas). Em alguns aspectos, as formulações da presente descrição podem ser usadas para tratar condições ou distúrbios oculares em que o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é super-regulado, desregulado ou hiperativo. Em alguns aspectos, as formulações da presente descrição podem ser usadas para tratar condições ou distúrbios oculares, incluindo, porém, não se limitando a, degeneração macular relacionada à idade, edema macular, edema macular diabético (DME), retinopatia, retinopatia diabética, degeneração miópica, neovascularização coroidal idiopática, neovascularização coroidal inflamatória, neovascularização retiniana, vasculopatia coroidal poliploide, neovascularização

do olho, oclusão da veia retiniana do ramo (BRVO), oclusão da veia retiniana central, coriorretinopatia serosa central, retinite, retinite pigmentosa, doença de Stargardt, síndrome de Usher, degeneração retiniana, endoftalmite, vitreorretinopatia exsudativa familiar, telangiectasia justafoveal idiopática, degeneração em treliça, buraco macular, vasculatura fetal persistente, oclusão da artéria retiniana e retinoblastoma. Em alguns aspectos, as formulações da presente descrição podem ser usadas para tratar condições ou distúrbios oculares, incluindo, porém, não se limitando a, degeneração macular relacionada à idade, degeneração macular relacionada à idade úmida e degeneração macular relacionada à idade neovascular.

[00172] A invenção também apresenta kits. Os kits podem ser usados, por exemplo, para praticar qualquer um dos métodos descritos ou exemplificados neste documento. Em alguns aspectos, um kit compreende qualquer formulação de anticorpo descrita ou exemplificada aqui e instruções para usar a formulação de anticorpo em qualquer um dos métodos ou usos descritos ou exemplificados aqui. O kit pode compreender um dispositivo para injetar a formulação de anticorpo em um indivíduo, incluindo, porém, não se limitando a uma seringa e agulha ou cateter.

[00173] As instruções incluídas com o kit podem incluir instruções para administrar a formulação de anticorpo em um método para o tratamento de câncer ovariano epitelial recorrente resistente à platina, trompa de Falópio ou peritoneal primário, incluindo instruções para injetar a formulação de anticorpo em um paciente com câncer ovariano epitelial recorrente resistente à platina, trompa de Falópio ou peritoneal primário em necessidade do mesmo. Em alguns aspectos, as instruções incluídas com o kit podem incluir instruções para administrar a formulação de anticorpo em um método para tratar câncer cervical persistente, recorrente ou metastático, incluindo instruções para injetar a formulação de anticorpo em um paciente com câncer cervical persis-

tente, recorrente ou metastático em necessidade do mesmo. Em alguns aspectos, as instruções incluídas com o kit podem incluir instruções para administrar a formulação de anticorpo em um método para tratar câncer colorretal metastático, incluindo instruções para injetar a formulação de anticorpo em um paciente com câncer colorretal metastático em necessidade do mesmo. Em alguns aspectos, as instruções incluídas com o kit podem incluir instruções para administrar a formulação de anticorpo em um método para tratar câncer de mama de HER2 negativo metastático, incluindo instruções para injetar a formulação de anticorpo em um paciente com câncer de mama de HER2 negativo metastático em necessidade do mesmo. Em alguns aspectos, as instruções incluídas no kit podem incluir instruções para administrar a formulação de anticorpo em um método para o tratamento de carcinoma de células renais metastático, incluindo instruções para injetar a formulação de anticorpo em um paciente com carcinoma de células renais metastático em necessidade do mesmo. Em alguns aspectos, as instruções incluídas com o kit podem incluir instruções para administrar a formulação de anticorpo em um método para o tratamento de glioblastoma, incluindo instruções para injetar a formulação de anticorpo em um paciente com glioblastoma em necessidade do mesmo. Em alguns aspectos, as instruções incluídas com o kit podem incluir instruções para administrar a formulação de anticorpo em um método para tratar câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), incluindo instruções para injetar a formulação de anticorpo em um paciente com câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) em necessidade do mesmo. As instruções incluídas com o kit podem incluir instruções para administrar a formulação de anticorpo em um método para o tratamento de uma condição ocular, incluindo, porém, não se limitando àquelas da retina, esclera, vítreo, cristalino, pupila, íris, córnea, coróide, nervo ótico, vasculatura retiniana, corpo ciliar ou ângulo do

olho (incluindo a rede trabecular e estruturas associadas). Em alguns aspectos, as composições da presente descrição podem ser usadas para tratar condições ou distúrbios oculares em que o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é super-regulado, desregulado ou hiperativo. Em alguns aspectos, as instruções incluídas com o kit podem incluir instruções para administrar a formulação de anticorpo em um método para o tratamento de condições ou distúrbios oculares, incluindo, porém, não se limitando a, degeneração macular relacionada à idade, edema macular, edema macular diabético (DME), retinopatia, retinopatia diabética, degeneração miópica, neovascularização coroidal idiopática, neovascularização coroidal inflamatória, neovascularização retiniana, vasculopatia coroidal poliploide, neovascularização do olho, oclusão da veia retiniana do ramo (BRVO), oclusão da veia retiniana central, coriorretinopatia serosa central, retinite, retinite pigmentosa, doença de Stargardt, síndrome de Usher, degeneração retiniana, endoftalmite, vitreorretinopatia exsudativa familiar, telangiectasia justafoveal idiopática, degeneração em treliça, buraco macular, vasculatura fetal persistente, oclusão da artéria retiniana e retinoblastoma. Em alguns aspectos, as instruções incluídas no kit podem incluir instruções para administrar a formulação de anticorpo em um método para o tratamento de condições ou distúrbios oculares, incluindo, porém, não se limitando a, degeneração macular relacionada à idade, degeneração macular relacionada à idade úmida e degeneração macular relacionada à idade neovascular.

[00174] Os seguintes exemplos são fornecidos para descrever a invenção em mais detalhes. Destinam-se a ilustrar, não a limitar, a invenção.

Exemplo 1 - Materiais e Métodos

[00175] Introdução. O anticorpo ONS-5010 representa um bioequivalente do bevacizumabe e foi reformulado para estabilidade de armazenamento realçada. Acredita-se que a formulação tamponada pode, pe-

lo menos, reduzir a agregação do anticorpo durante o armazenamento de longo prazo. Acredita-se que a formulação tamponada pode reduzir a dimerização não covalente e covalente da molécula de bevacizumabe. O bevacizumabe comercializado como Avastin® (Genentech, Inc.) é formulado em um tampão de fosfato de sódio, incluindo trealose como um estabilizador e incluindo um tensoativo suave e um pH ácido de 6,2. A abordagem experimental descrita abaixo incluiu trabalho de desenvolvimento para reformular o bevacizumabe para estabilidade coloidal realçada. O realce significativo na estabilidade e, particularmente no que diz respeito a uma redução na agregação, foi alcançado alterando o tampão e o pH.

[00176] Dispersão de Luz Dinâmica (DLS). O método de teste de DLS usou uma Leitora de Placa Wyatt DynaPro™ para fornecer informações sobre a distribuição do tamanho da proteína e estabilidade coloidal geral em solução. O raio hidrodinâmico forneceu informações sobre a presença de agregação e confirmação da estrutura da molécula em solução. O teste de DLS forneceu uma medida ortogonal da distribuição de tamanhos em solução sob condições não desnaturantes.

[00177] Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC). A calorimetria de varredura diferencial mediu as transições de fusão para a proteína e, assim, forneceu informações sobre a estabilidade térmica da proteína em solução. A calorimetria foi realizada usando um sistema de DSC GE VP Capillary. A proteína foi aquecida de 25 °C a 95 °C a uma taxa de varredura otimizada, permitindo que as transições de fusão (T_m) ocorressem enquanto a proteína estava se desdobrando. Um controle tampão foi aquecido ao lado da amostra e usado para calcular as temperaturas de fusão e as transições. O perfil de DSC era típico de anticorpos e demonstrou que a proteína se dobrou em domínios distintos.

[00178] Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SE-HPLC). SE-HPLC foi usada para monitorar a distribuição de variantes de tamanho

de anticorpo. O método de teste de SE-HPLC separa as proteínas com base no tamanho. As espécies que eluíram antes do pico do monômero foram agregados (HMWS) e os picos que eluíram após o pico do monômero foram degradantes (LMWS).

[00179] As espécies foram separadas usando uma coluna TSK3000SWxl 7,8 mm x 300 mm (Tosoh Bioscience Cat# 08541), com uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min e um tempo de execução de 30 minutos; coluna à temperatura ambiente. A fase móvel compreendia fosfato de potássio 0,2 M e cloreto de potássio 0,25 M e um pH de 6,2. Havia duas formas de injeção de amostra - injeção pura 10uL @ 25 mg/mL e injeção diluída 100uL @ 0,5 mg/mL (Injeção pura mede os agregados totais incluindo agregados reversíveis, injeção diluída mede os dímeros principalmente de natureza covalente). As amostras diluídas foram diluídas com a fase móvel A (fosfato de potássio 0,2 M, cloreto de potássio 0,25 M, pH 6,2) para 0,5 mg/mL.

[00180] As amostras foram incubadas por 24 horas antes da análise a 30 °C. A temperatura do amostrador automático foi mantida a 30 °C durante toda a duração da execução. Os dados foram analisados em 280 nm.

[00181] Cromatografia de Troca Catiônica (CEX). As amostras de bevacizumabe foram diluídas na fase móvel A e digeridas com carboxipeptidase B. As espécies foram separadas usando uma coluna de HPLC de troca catiônica. Um gradiente foi realizado com a fase móvel A e a fase móvel B usando uma taxa de fluxo de 0,5mL/minuto. A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C e as amostras foram mantidas a 2-8 °C. Os dados foram analisados a 280 nm.

[00182] Conteúdo de Partículas (Imageamento de Fluido). O sistema de Imageamento de Fluido (FI) é um sistema integrado para analisar rapidamente as partículas em um fluido em movimento. O sistema conta, imagea e analisa automaticamente as partículas ou células em

uma amostra ou fluxo contínuo. No sistema de FI, a amostra é puxada para a câmara de fluxo por uma bomba. Usando o laser no Modo Autolmage, o sistema de FI monitorou a dispersão de luz das partículas de passagem. A câmera foi configurada para capturar imagens de forma síncrona em um intervalo definido pelo usuário. Os valores de detecção de dispersão foram salvos pelo VisualSpreadsheet (além de todas as outras propriedades das partículas e da imagem). O computador e o processador de sinal digital trabalham juntos para iniciar, recuperar e processar imagens do campo de visão.

[00183] Osmolalidade. Um Osmômetro foi usado para medir a osmolalidade de soluções tampão e de proteína por meio da medição do ponto de congelamento. Ele utilizou termômetros de alta precisão para detectar a temperatura da amostra, para controlar o grau de super-resfriamento e indução de congelamento e para medir o ponto de congelamento da amostra. O requisito de amostra era de 20 µL por medição.

[00184] Fluorescência Intrínseca. A Espectroscopia de Fluorescência Intrínseca é um método de caracterização biofísica não invasiva que fornece informações sobre a estrutura terciária da proteína. Este método mediu o grau de desdobramento da estrutura da proteína. Intensidade e comprimento de onda máximo de uma amostra de proteína (por exemplo, emissão de triptofano) foram determinados no espectrômetro de fluorescência. Testar 600µL de solução de proteína de 0,1mg/mL por repetição. Varredura de emissão: Excitação em 295nm, início em 310nm e final em 450nm.

[00185] Ensaio de Neutralização de VEGF Baseado em Células HUVEC. O principal mecanismo de ação do anticorpo monoclonal antiangiogênese bevacizumabe é ligar-se ao VEGF e evitar a ligação ao seu receptor cognato. Desta forma, o bevacizumabe neutraliza a capacidade do VEGF de induzir a proliferação de células endoteliais; portanto, a potência de um anticorpo anti-VEGF pode ser quantificada por

sua capacidade de inibir a proliferação de células induzida por VEGF. No ensaio de potência baseado em células HUVEC, concentrações fixas de VEGF são incubadas com o fármaco diluído em série. O bevacizumabe liga-se ao VEGF de uma maneira dependente da dose, tornando o VEGF indisponível para outras interações de ligação. Este coquetel de fármaco-VEGF é, então, adicionado a células HUVEC semeadas em placas de múltiplas cavidades e posteriormente incubadas para proliferação contínua. Durante a incubação, as células HUVEC proliferam de maneira dependente da concentração de VEGF. Em baixas concentrações de fármaco, mais VEGF está disponível e, portanto, a proliferação é alta e vice-versa. A inibição dependente da dose de anticorpos da proliferação de células HUVEC é avaliada pela quantificação do número de células viáveis no final da incubação. O ensaio de neutralização de VEGF é um ensaio relativo no qual a potência das amostras é medida em relação a um padrão de referência. O ensaio consiste em três placas de ensaio independentes. Em cada placa, os dados de viabilidade celular de padrão e amostras são ajustados a modelos logísticos 4P para gerar curvas sigmoidais com parâmetros de curva independentes usando software estatístico; os parâmetros da curva padrão e da amostra são comparados para avaliar o paralelismo da curva e, quando considerado paralelo, a potência relativa dos artigos de teste é calculada. O valor final relatado é uma média de três valores independentes que estão dentro da variabilidade aceitável.

[00186] Imunoensaio de ligação ao VEGF. O principal mecanismo de ação do anticorpo monoclonal antiangiogênese bevacizumabe é ligar-se ao VEGF e evitar a ligação ao seu receptor cognato, inibindo assim os efeitos mitogênicos mediados pelo VEGF nas células endoteliais vasculares. Esta neutralização do VEGF pelo bevacizumabe inibe o processo de angiogênese, que por sua vez suprime a sobrevivência e a progressão do tumor. Portanto, a potência de um anticorpo anti-

VEGF pode ser quantificada medindo sua ligação ao VEGF em um ELISA. Neste ensaio, uma concentração fixa de VEGF é primeiro revestida em placas de múltiplas cavidades. Depois de bloquear os sítios de ligação não específicos, o VEGF imobilizado é reagido com o padrão de Referência diluído em série e as amostras de Teste. O anticorpo não ligado é lavado e as cavidades são incubadas com anticorpo de cadeia leve anti-capça conjugado com peroxidase de rábano silvestre (HRP) que se liga aos complexos VEGF-Anticorpo. Em seguida, o anticorpo secundário não ligado é lavado e as cavidades são incubadas com substrato de HRP de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) para produzir um produto colorido. O desenvolvimento da cor é extinto pela adição de ácido fosfórico e os valores de absorvência são lidos. Os valores de densidade ótica (D.O.) obtidos são diretamente proporcionais à quantidade de amostra ligada ao VEGF. O ensaio de ligação ao VEGF é um ensaio relativo no qual a potência das amostras é medida em relação a um padrão de referência. O ensaio consiste em duas placas de ensaio independentes. Em cada placa, os dados de O.D. de padrões e amostras são ajustados a modelos logísticos 4P para gerar curvas sigmoidais com parâmetros de curva independentes usando software estatístico; os parâmetros da curva padrão e da amostra são comparados para avaliar o paralelismo da curva e, quando considerado paralelo, a potência relativa dos artigos de teste é calculada. O valor final relatado é uma média de dois valores independentes que estão dentro da variabilidade aceitável.

Exemplo 2 - Efeito do Tampão, Estabilizadores e pH na Estabilidade Conformacional e Coloidal do Bevacizumabe

[00187] Experimentos iniciais avaliaram os componentes do tampão para a estabilidade conformacional e coloidal do bevacizumabe. Foi determinado que os tampões de citrato, fosfato e acetato são ideais para a estabilidade do bevacizumabe. Além disso, individualmente es-

tes tampões exibiram um efeito protetor em relação à agregação de bevacizumabe que é induzida por aquecimento ou agitação relacionada ao estresse. Outros experimentos avaliaram se uma combinação desses tampões (citrato, fosfato e acetato) exibia efeitos estabilizadores superiores. Um tampão de fosfato de citrato produziu agregados significativamente mais baixos (incluindo dímeros do tipo covalente) e espécies de carga mais baixa em relação ao tampão de fosfato de sódio na composição de combinação de bevacizumabe (combinada com a formulação da formulação de Avastin® disponível comercialmente).

[00188] O efeito do estabilizador de trealose em um tampão de fosfato de sódio 50 mM foi comparado com estabilizadores alternativos, incluindo sacarose, sorbitol, manitol e glicina. Estabilidade conformacional do anticorpo nas diferentes composições de tampão estabilizada diferente foi, em seguida, avaliada por DSC (Fig. 1). Esses dados são apresentados na Tabela 1 e mostram que todos os estabilizadores testados foram iguais ou melhores que a trealose.

Tabela 1. Agentes estabilizadores conformacionais alternativos em tampão de fosfato de sódio.

Condições de Tampão	Todas as condições: fosfato de sódio a 50mM	pH do Tampão Final	T _{m1}	T _{m2}
1	Trealose a 60 mg/mL (combinação)	6,20	73,3	83,5
2	Trealose a 25 mg/mL	6,26	73,0	83,0
3	Sacarose a 25 mg/mL	6,13	72,9	82,9
4	Sacarose a 60 mg/mL	6,11	73,4	83,4
5	Sorbitol a 25 mg/mL	6,19	73,1	82,9
6	Sorbitol a 60 mg/mL	6,12	73,6	83,5
7	Manitol a 25 mg/mL	6,19	73,0	83,2
8	Manitol a 60 mg/mL	6,05	73,7	83,4
9	Glicina a 16 mg/mL	6,11	73,5	83,3
10	Glicina a 25 mg/mL	6,05	73,9	83,6

[00189] Os estabilizadores alternativos (sacarose, sorbitol, manitol e glicina) foram usados em seguida com o tampão de fosfato de citrato e a estabilidade conformacional do anticorpo bevacizumabe foi avaliada por DSC. Os dados são apresentados na Tabela 2 e mostram que os estabilizadores alternativos em um tampão de fosfato de citrato foram iguais ou melhores do que a formulação de combinação de bevacizumabe.

Tabela 2. Agentes estabilizadores conformacionais alternativos em tampão de fosfato de citrato (C/P).

Condição de Tampão	Amostra	pH	Tm1	Tm2
1	Combinação de Bevacizumabe: fosfato de sódio a 50 mM, Trealose a 60 mg/mL	6,20	73,3	83,5
2	C/P sacarose a 50 mM 60 gm/mL	6,15	73,0	83,0
3	C/P sorbitol a 50 mM 60 mg/mL	6,14	73,3	83,3
4	C/P manitol a 50 mM 60 mg/mL	6,11	73,3	83,2
5	C/P glicina a 50 mM 25 mg/mL	6,1	73,5	83,6

[00190] Usando o tampão de fosfato de citrato com trealose como o agente estabilizador, o efeito do pH na estabilidade conformacional do anticorpo (bevacizumabe) foi avaliado. DSC foi usada para medir a estabilidade do anticorpo. Os dados, apresentados na Tabela 3, mostram que as temperaturas de desdobramento para Bevacizumabe, conforme medidas em cada composição de formulação, são comparáveis às observadas para a composição de combinação de Bevacizumabe, porém, apenas em pH superior a 5,6 (5,6, 5,8, 6,0, 6,2). Em pH mais baixo (particularmente 5,0), um evento de desdobramento precoce ocorre a uma temperatura mais baixa de cerca de 65 °C, tornando assim esse pH mais baixo (abaixo de 5,6) inadequado para a formulação de bevacizumabe.

Tabela 3. Efeito do pH sobre a estabilidade térmica/conformacional do

bevacizumabe em um tampão de citrato 50 mM ou de fosfato de citrato 50 mM.

Amostra	pH do Tampão Final	Tm1	Tm2	Tm3
Combinação de Bevacizumabe	6,20	73,4	83,5	
Cit Treh a 35mM 60 mg/mL pH 5,8	5,79	72,3	83,0	
Cit Treh a 50mM 60 mg/mL pH 5,0	4,99	65,3	71,1	79,6
Cit Treh a 50mM 60 mg/mL pH 5,2	5,13	71,5	80,9	
Cit Treh a 50mM 60 mg/mL pH 5,4	5,32	71,9	82,0	
Cit Treh a 50mM 60 mg/mL pH 5,6	5,51	72,1	82,4	
Cit Treh a 50mM 60 mg/mL pH 5,8	5,70	72,2	82,8	
Cit Treh a 50mM 60 mg/mL pH 6,0	5,93	72,3	82,8	
Cit Treh a 50mM 60 mg/mL pH 6,2	6,13	72,4	83,0	
C/P Treh a 50mM 60 mg/mL pH 5,0	5,08	72,2	81,2	
C/P Treh a 50mM 60 mg/mL pH 5,2	5,25	72,5	81,9	
C/P Treh a 50mM 60 mg/mL pH 5,4	5,43	72,8	82,3	
C/P Treh a 50mM 60 mg/mL pH 5,6	5,66	72,8	83,1	
C/P Treh a 50mM 60 mg/mL pH 5,8	5,92	72,9	83,1	
C/P Treh a 50mM 60 mg/mL pH 6,0	6,13	73,0	83,2	
C/P Treh a 50mM 60 mg/mL pH 6,2	6,26	73,1	83,4	

[00191] Experimentos paralelos avaliaram o acetato como agente de tamponamento. O acetato foi avaliado em concentrações de 5 mM, 15 mM e 25 mM, com pH variável (Tabelas 4 e 5). Estes experimentos compararam a sacarose (60 mg/ml) e a trealose (60 mg/ml) como o agente estabilizador. A estabilidade da molécula de bevacizumabe em cada composição foi, então, avaliada por DSC. Os dados são apresentados nas Tabelas 4 e 5. Observou-se que o aumento da molaridade do acetato diminuiu a Tm, e o aumento do pH também diminuiu a Tm (Tabelas 4 e 5). A estabilidade conformacional realçada foi mostrada para pH 5,6 e 5,8 (Tabela 5).

Tabela 4. Estabilidade conformacional de bevacizumabe em formulações tamponadas com trealose de acetato.

Amostra	pH Final	Tm1	Tm2
Combinação de Bevacizumabe Fosfato a 50 mM pH 6,2	6,20	73,4	83,5
Acetato a 5 mM Treh 159 mM, pH 5,6	5,51	74,2	83,3
Acetato a 15 mM Treh 159 mM, pH 5,6	5,52	73,9	83,3
Acetato a 25 mM Treh 159 mM, pH 5,6	5,56	73,8	83,0
Acetato a 5 mM Treh 159 mM, pH 5,8	5,78	74,1	83,5
Acetato a 15 mM Treh 159 mM, pH 5,8	5,77	74,0	83,3
Acetato a 25 mM Treh 159 mM, pH 5,8	5,76	73,8	83,3
Acetato a 5 mM Treh 159 mM, pH 6,0	5,93	74,1	83,6
Acetato a 15 mM Treh 159 mM, pH 6,0	5,91	73,9	83,4
Acetato a 25 mM Treh 159 mM, pH 6,0	5,97	73,8	83,7
Acetato a 5 mM Treh 159 mM, pH 6,2	6,11	74,1	83,8
Acetato a 15 mM Treh 159 mM, pH 6,2	6,15	73,8	83,8
Acetato a 25 mM Treh 159 mM, pH 6,2	6,14	73,6	83,8

Tabela 5. Estabilidade conformacional de bevacizumabe em formulações tamponadas com sacarose de acetato.

Amostra	pH do Tampão Real	pH Final @ 0,5 mg/mL	Tm1	Tm2
Combinação de Bevacizumabe Fosfato a 50 mM pH 6,2	6,20	6,20	73,4	83,7
Acetato a 5 mM 60 mg/mL de Suc pH 5,6	5,57	5,72	74,1	83,4
Acetato a 15 mM 60 mg/mL de Suc pH 5,6	5,52	5,60	73,9	83,0
Acetato a 5 mM 60 mg/mL de Suc pH 5,8	5,76	5,92	74,1	83,4
Acetato a 15 mM 60 mg/mL de Suc pH 5,8	5,73	5,80	73,9	83,3

Exemplo 3 - Estabilidade de Armazenamento em Formulações de Trealose Tamponada Com Fosfato de Citrato e Sacarose de Acetato

[00192] Quatro formulações tamponadas foram selecionadas para avaliar a estabilidade de armazenamento de longo prazo da molécula

de bevacizumabe ao longo de 18 meses. Essas formulações foram executadas em paralelo com a formulação de combinação/referência de bevacizumabe (condição 1). As condições de armazenamento foram as seguintes: anticorpo em ~ 25 mg/ml (puro) ou diluído; armazenamento a 5 °C, 30 °C ou 37 °C; agitação a 150 RPM à temperatura ambiente; e congelamento/descongelamento (20 °C à temperatura ambiente, durante três ciclos). As formulações testadas estão listadas abaixo:

Condição 1: Combinação de Bevacizumabe (Avastin®)

Fosfato Sódico a 50 mM

Trealose a 159 mM

0,04% de polissorbato 20

pH 6,20

Q.S. com água Estéril para injeção

Condição 2: Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 5,8

Fosfato de Citrato a 50 mM

Trealose a 159 mM

0,04% de Polissorbato 20

pH 5,80

Q.S. com Água Estéril para injeção

Condição 3: Fosfato de Citrato de Bevacizumabe, pH 6,0

Fosfato de Citrato a 50 mM

Trealose a 159 mM

0,04% de Polissorbato 20

pH 6,0

Q.S. com Água Estéril para injeção

Condição 4: Acetato de Bevacizumabe, pH 5,6

Acetato a 15 mM

Sacarose a 175 mM

0,04% de Polissorbato 20

pH 5,60

Q.S. com Água Estéril para injeção

Condição 5: Acetato de Bevacizumabe, pH 5,8

Acetato a 15 mM

Sacarose a 175 mM

0,04% de Polissorbato 20

pH 5,80

Q.S. com Água Estéril para injeção

[00193] A estabilidade do anticorpo em cada condição de armazenamento foi testada por uma bateria de ensaios de caracterização analítica e estendida de rotina, incluindo, porém, não se limitando, a cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), cromatografia de troca catiônica (CEX), CE-SDS, ensaio de neutralização de VEGF baseado em célula HUVEC, imunoenensaio de ligação ao VEGF e contagem de partículas (PC). A cromatografia de exclusão por tamanho foi usada para avaliar a porcentagem de monômeros de anticorpos, a porcentagem de agregados totais (covalentes e não covalentes) e a porcentagem de degradantes. A estabilidade comparativa de ambos os tipos de formulação foi avaliada junto com a composição de referência/combinção de bevacizumabe (Avastin®). As amostras com estabilidade de armazenamento de longo prazo armazenadas a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ao longo de 18 meses, indicam que ambas as composições à base de fosfato de citrato (Condições 2 e 3) e as composições à base de tampão de acetato (Condições 4 e 5) são mais estáveis do que a composição de combinação de Avastin® (Fig. 2A; Fig. 2A (i); Fig 2A (ii); Tabela 6). Figura 2B, Figura 2B (i), Figura 2B (ii) e Tabela 7 indicam que os dímeros covalentes medidos estão presentes em todas as cinco composições biossimilares de bevacizumabe, no entanto, as Condições 2, 3, 4 e 5 têm dímeros covalentes mais baixos do que aqueles presentes na

composição de combinação de bevacizumabe (condição 1) (Tabela 7).

Tabela 6. Agregados totais em formulações biossimilares de bevacizumabe (estabilidade de longo prazo a 5 °C) conforme medido por SE-HPLC (injeção pura).

Composição de Formulação	% de Agregados				
Tempo (a 5°C)	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4	Condição 5
T0	6,0	3,1	3,5	5,7	6,2
2 Meses	6,3	3,4	3,8	3,4	4,9
3,5 Meses	6,3	3,3	3,9	3,4	4,9
7 Meses	6,5	3,5	4,0	3,6	4,9
12 Meses	6,4	3,4	4,0	3,0	4,1
18 Meses	7,0	3,9	4,3	3,4	4,6

Tabela 7. Dímeros covalentes em formulações biossimilares de bevacizumabe (estabilidade de longo prazo), conforme medido por SE-HPLC (injeção diluída).

Composição de Formulação	% de Dímero Covalente				
Tempo (a 5°C)	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4	Condição 5
T0	1,7	1,7	1,7	1,5	1,4
3,5 Meses	2,0	2,4	1,9	2,3	2,0
7 Meses	2,5	2,2	2,5	2,1	2,2
12 Meses	2,4	2,1	2,1	1,7	1,9
18 Meses	2,9	2,5	2,6	2,1	2,3

[00194] Espécies carregadas ácidas medidas por cromatografia de troca catiônica (CEX) também foram testadas para todas as amostras durante o estudo de estabilidade de armazenamento longo de 18 meses (Tabela 7 (i); Figura 2B (iii); Figura 2B (iv) e Figura 2B (v)). Em todas as 5 composições, as espécies carregadas, particularmente as espécies carregadas ácidas, não variaram significativamente ao longo dos 18 meses de armazenamento a 5 °C.

Tabela 7 (i). % de Espécies Ácidas em formulações biossimilares de bevacizumabe (estabilidade de longo prazo) conforme medido por

CEX-HPLC.

Composição de Formulação	% de Espécies Ácidas				
Tempo (a 5°C)	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4	Condição 5
T0	22,9	25,7	26,5	26,9	26,7
3,5 meses	28,3	27,9	28,1	28,4	27,9
7 meses	29,2	28,8	29,1	29,4	29,4
12 meses	29,7	28,6	29,0	29,5	28,9
18 meses	28,7	27,3	27,3	27,6	27,4

[00195] A potência relativa para formulações biossimilares de bevacizumabe medida pelo ensaio de neutralização de VEGF baseado em células HUVEC foi encontrada dentro de 90-110% para todas as condições (condição 2-5) em comparação com a Condição 1 (Tabela 7 (ii)). Esta descoberta também confirma que a potência das formulações (condição 2-5) não é afetada devido a alterações na composição da formulação e é equivalente à formulação da composição de Avastin ao longo de 18 meses de armazenamento a 2-8 °C.

Tabela 7 (ii). Potência relativa para formulações biossimilares de bevacizumabe (condições 1 a 5) conforme medido pelo ensaio de neutralização de VEGF baseado em células HUVEC após 18 meses de armazenamento a 2-8 °C.

Descrição da Amostra	Potência Relativa Comparada à Condição 1
Condição 1	100
Condição 2	103
Condição 3	101
Condição 4	100
Condição 5	99

[00196] A potência relativa para formulações biossimilares de bevacizumabe, medida por Imunoensaio de ligação ao VEGF, foi encontrada dentro de 90-100% para todas as condições (condição 2-5) em comparação com a Condição 1 (Tabela 7 (iii)). Esta descoberta também confirma que a potência das formulações (condição 2-5) não é

afetada devido a alterações na composição da formulação e é equivalente à formulação da composição de Avastina ao longo de 18 meses de armazenamento a 2-8 °C.

Tabela 7 (iii). Potência relativa para formulações biossimilares de bevacizumabe (condições 1 a 5) conforme medido pelo Imunoensaio de ligação de VEGF após 18 meses de armazenamento a 2-8 °C.

Descrição da Amostra	Potência Relativa Comparada à Condição 1
Condição 1	100%
Condição 2	95%
Condição 3	93%
Condição 4	97%
Condição 5	97%

[00197] As amostras na estabilidade de armazenamento acelerado (30 °C) indicam que ambas as composições à base de fosfato de citrato e as composições à base de tampão de acetato são mais estáveis do que a composição de combinação de bevacizumabe (Avastin®) (Fig. 2C e Fig. 2D; Tabelas 8 e 9). A Figura 2D e a Tabela 9 indicam que existem dímeros covalentes mensuráveis em todas as cinco composições biossimilares de bevacizumabe. Todas as condições de formulação biossimilares (2-5) foram constatadas ter dímeros covalentes mais baixos do que aqueles presentes na composição de combinação de bevacizumabe.

Tabela 8. Agregados totais em formulações biossimilares de bevacizumabe (estabilidade acelerada a 30 °C) conforme medido por SE-HPLC (injeção pura).

Composição de Formulação	% de Agregados				
Tempo (a 30°C)	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4	Condição 5
T0	6,0	3,1	3,5	5,7	6,2
Dia 7	6,1	3,3	3,3	3,8	5,3
Dia 14	6,6	3,5	4,1	3,9	5,7
3,5 Meses	8,3	4,6	5,3	4,1	6,2

Tabela 9. Dímeros covalentes em formulações bioequivalentes de bevacizumabe (estabilidade acelerada a 30 °C) conforme medido por SE-HPLC (injeção diluída).

Condição da Formulação	% de Dímero Covalente				
Tempo (a 30°C)	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4	Condição 5
T0	1,7	1,7	1,7	1,5	1,4
2 Meses	3,6	2,8	3,0	2,3	2,5
3,5 Meses	4,0	3,2	3,7	2,7	3,2

[00198] Amostras na estabilidade de armazenamento acelerado (37 °C) indicaram que ambas as composições à base de fosfato de citrato e as composições à base de tampão de acetato são mais estáveis do que a composição de combinação de bevacizumabe (Fig. 2E e Fig. 2F; Tabelas 10 e 11). A Figura 2F e a Tabela 11 indicam a presença de dímeros covalentes mensuráveis em todas as cinco composições bioequivalentes de bevacizumabe. No entanto, todas as condições (2-5), têm dímeros covalentes mais baixos do que aqueles presentes na composição de combinação de bevacizumabe.

Tabela 10. Agregados totais em formulações bioequivalentes de bevacizumabe (estabilidade acelerada a 37 °C) conforme medido por SE-HPLC (injeção pura).

Composição de Formulação	% de Agregados				
Tempo (a 37°C)	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4	Condição 5
T0	6,0	3,1	3,5	5,7	6,2
Dia 7	6,7	3,4	4,0	3,9	5,7
Dia 14	7,3	3,9	4,6	4,0	6,2
Dia 21	7,8	4,2	4,9	4,3	6,2
Dia 28	8,3	4,4	5,1	4,2	5,6
2 Meses	9,9	5,2	5,9	4,6	6,4

Tabela 11. Dímeros covalentes em formulações biossimilares de bevacizumabe (estabilidade acelerada a 37 °C) conforme medido por SE-HPLC (injeção diluída).

Composição de Formulação	% de Dímero Covalente				
	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4	Condição 5
Tempo (a 37 °C)					
T0	1,7	1,7	1,7	1,5	1,4
2 Meses	5,1	3,7	3,8	3,0	3,2

[00199] Amostras em teste de estresse (agitação à temperatura ambiente a 150 rpm), indicam que ambas as composições à base de fosfato de citrato e as composições à base de tampão de acetato são mais estáveis do que a composição de combinação de bevacizumabe (Avastin®) (Fig. 2G e Fig. 2H; Tabelas 12 e 13). A composição de Acetato-Sacarose (condição 5) teve uma porcentagem ligeiramente maior de agregado, indicando que o pH de 5,6 é preferido para a estabilidade da formulação de bevacizumabe acima do pH 5,8. A Figura 2H e a Tabela 13 indicam os dímeros covalentes medidos em todas as cinco composições biossimilares de bevacizumabe. Todas as condições (2-5), foram observadas para ter dímeros covalentes mais baixos do que aqueles presentes na composição de combinação de bevacizumabe (Avastin®).

Tabela 12. Agregados totais em formulações biossimilares de bevacizumabe (agitação a 150 rpm) conforme medido por SE-HPLC (injeção pura).

Tempo da Composição de Formulação (agitação a 150 rpm)	% de Agregados				
	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4	Condição 5
T0	6,0	3,1	3,5	5,7	6,2
Dia 7	6,4	3,3	3,9	4,0	5,3
Dia 14	6,5	3,2	4,0	4,0	6,0
Dia 21	6,7	3,8	4,3	4,2	5,7

Tabela 13. Dímeros covalentes em formulações biossimilares de bevacizumabe (agitação a 150 rpm) conforme medido por SE-HPLC (injeção diluída).

Tempo da Composição de Formulação (agitação a 150 rpm)	% de Dímero Covalente				
	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4	Condição 5
T0	1,7	1,7	1,7	1,5	1,4
Dia 21	2,8	2,2	2,4	2,0	2,1

[00200] Amostras no teste de estresse (teste de congelamento/descongelamento) indicam que ambas as composições à base de fosfato de citrato e as composições à base de tampão de acetato são equivalentes à composição de combinação de bevacizumabe (Avas-tin®) no que diz respeito a oferecer proteção contra o estresse do congelamento/descongelamento (Fig. 2I e Fig. 2J; Tabelas 14 e 15). A composição de Acetato-Sacarose (condição 5) teve uma porcentagem ligeiramente maior de agregado, indicando que o pH de 5,6 é preferido para a estabilidade da formulação de bevacizumabe acima de pH 5,8. A Figura 2J e a Tabela 15 indicam a presença de dímeros covalentes mensuráveis em todas as cinco composições biossimilares de bevacizumabe. Todas as condições (2-5), tiveram dímeros covalentes mais baixos do que aqueles presentes na composição de combinação de bevacizumabe.

Tabela 14. Agregados totais em formulações biossimilares de bevacizumabe (agitação a 150 rpm) conforme medido por SE-HPLC (injeção pura).

Teste de estresse de Congelamento/Descongelamento da Composição de Formulação	% de Agregados				
	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4	Condição 5
T0	6,0	3,1	3,5	5,7	6,2
ciclo 1 TA/-20°C	6,1	3,1	3,8	3,7	5,2
ciclo 3 TA/-20°C	6,2	3,2	3,7	3,6	5,8

Tabela 15. Dímeros covalentes em formulações biossimilares de bevacizumabe (estresse de congelamento/descongelamento) conforme medido por SE-HPLC (injeção diluída).

Teste de estresse de Congelamento/Descongelamento das Condições de Formulação	% de Dímero Covalente				
	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4	Condição 5
T0	1,7	1,7	1,7	1,5	1,4
ciclo 1 TA/-20°C	1,7	1,7	1,7	1,6	1,6
ciclo 3 TA/-20°C	1,7	1,6	1,8	1,6	1,7

Exemplo 4 - Propriedades Biofísicas de Biossimilar de Bevacizumabe em Formulações de Trealose Tamponada com Fosfato de Citrato e de Sacarose de Acetato

[00201] As propriedades biofísicas das quatro formulações de teste biossimilares tamponadas foram avaliadas em paralelo com a formulação de referência de combinação de bevacizumabe. Propriedades biofísicas incluindo, porém, não se limitando àquelas testadas por Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC), Dispersão de Luz Dinâmica (DLS), Espectroscopia de Fluorescência (Int. Fl.) foram avaliadas. A similaridade dos biossimilares foi avaliada por várias ferramentas ortogonais, sendo esses métodos biofísicos uma tal abordagem dentro dos métodos analíticos ortogonais para avaliar a biossimilaridade. Ferramentas ortogonais indicam que as propriedades biofísicas de quatro formulações tamponadas de biossimilar de bevacizumabe (condição 2-5) foram semelhantes ou melhores do que a composição de combinação de bevacizumabe (condição 1).

[00202] As temperaturas de fusão e, portanto, o padrão de desdobramento térmico para bevacizumabe em todas as formulações é semelhante com um Tm1 de cerca de 73 °C e Tm2 de cerca de 83 °C (Tabela 16). Isso indica que todas as condições de formulação desenvolvidas oferecem estabilidade conformacional semelhante ao bevacizumabe. Em última análise, é o estudo de estabilidade de longo prazo

(armazenamento de 18 meses a 5 °C), conforme descrito no Exemplo 3, que identifica conclusivamente as condições 2-5 como formulações (isto é, composições) em que o Bevacizumabe é mais estável e menos propenso à agregação.

Tabela 16. Estabilidade conformacional de composições de formulações biossimilares de bevacizumabe medida por DSC.

Condição da Formulação	Amostra	pH do Tampão Real	Tm1	Tm2
1	Combinação de Bevacizumabe	6,2	73,3	83,3
2	Fosfato de Citrato de Bevacizumabe pH 5,8	5,8	72,8	82,8
3	Fosfato de Citrato de Bevacizumabe pH 6,0	6,0	72,4	82,9
4	Acetato de Bevacizumabe pH 5,6	5,6	73,5	83,1
5	Acetato de Bevacizumabe 5,8	5,8	73,6	83,3

[00203] A avaliação baseada na Dispersão de Luz Dinâmica (DLS) das propriedades hidrodinâmicas do biossimilar de bevacizumabe em todas as quatro condições de formulação foi avaliada em comparação com a composição de combinação de bevacizumabe (condição 1). O raio hidrodinâmico do biossimilar de bevacizumabe aumenta de cerca de 6 nm a 7 nm (a uma concentração de 15 mg/ml) nas condições 1-3 (Tabela 17, Figura 3). As condições de acetato, 4 e 5, mostraram tendências notáveis de tamanho diferente em comparação com a composição de combinação de bevacizumabe (condição 1), indicando uma melhor estabilidade coloidal. Enquanto o tamanho hidrodinâmico nas condições de fosfato de citrato, 2 e 3, a tendência foi semelhante à condição de combinação de bevacizumabe (condição 1), as tendências de formação de agregado reversível e de dímero covalente (armazenamento de longo prazo por um período de 18 meses e estabilidade de armazenamento em temperatura acelerada conforme descrito no exemplo 3) indica que oferece melhor proteção contra a agregação.

Tabela 17. Tamanho hidrodinâmico (média) e coeficiente de difusão (média) conforme medido para diferentes condições de formulação por DLS.

Formulação	Condição 1		Condição 2		Condição 3		Condição 4		Condição 5	
	Rh Médio (nm)	Coef. de Difusão Médio(nm)	Rh Médio (nm)	Coef. de Difusão Médio(nm)	Rh Médio (nm)	Coef. de Difusão Médio(nm)	Rh Médio (nm)	Coef. de Difusão Médio(nm)	Rh Médio (nm)	Coef. de Difusão Médio(nm)
1,0	5,6	4,31E-07	5,7	4,30E-07	5,6	4,24E-07	7,6	3,29E-07	6,1	2,51E-07
2,0	6,1	3,94E-07	6,4	3,80E-07	6,3	3,83E-07	6,2	3,87E-07	7,5	3,22E-07
5,0	6,7	3,59E-07	6,9	3,51E-07	6,7	3,60E-07	6,0	4,04E-07	6,3	3,82E-07
10,0	7,2	3,39E-07	7,2	3,31E-07	7,0	3,33E-07	5,8	4,20E-07	5,9	4,13E-07
15,0	7,3	3,27E-07	7,4	3,25E-07	7,4	3,21E-07	5,5	4,44E-07	5,5	4,42E-07
20,0	7,6	3,33E-07	7,9	3,06E-07	7,9	3,05E-07	5,1	4,76E-07	5,3	4,60E-07
25,7	8,0	3,02E-07	8,5	2,81E-07	8,7	2,85E-07	5,1	4,92E-07	5,2	4,73E-07

Nota: O Rh indicado em negrito aqui são medições multimodais.

[00204] A espectroscopia de fluorescência intrínseca indica todas as condições de formulação que oferecem estabilidade conformacional semelhante ao bevacizumabe como a composição de combinação (condição 1) (Tabela 18 e Fig. 4). Os principais descritores biofísicos deste teste (máximo da absorvência e máximo do comprimento de onda) são semelhantes para todas as condições de formulação.

Tabela 18. Espectros de fluorescência intrínsecos para todas as condições de formulação, indicando o máximo do pico médio e a absorvência

Condição da Formulação	Descrição da Formulação	Triptofano - 295/310	
		Máximo do Pico Médio (nm)	Absorvência Média
1	Combinação de Bevacizumabe	341	542,6
2	Fosfato de Citrato de Bevacizumabe pH 5,8	338	502,7
3	Fosfato de Citrato de Bevacizumabe pH 6,0	336	522,3
4	Acetato de Bevacizumabe pH 5,6	337	518,5
5	Acetato de Bevacizumabe pH 5,8	336	557,6

[00205] Bevacizumabe demonstrou ter uma sensibilidade significativa até mesmo a mudanças sutis no pH, levando a quantidades aumentadas de agregados presentes em intermediários do processo ou na substância de fármaco, se não controlado. O anticorpo ONS-5010 representa um biossimilar do bevacizumabe e o processo de ultrafiltração/diafiltração foi melhorado para realçar a estabilidade de armazenamento. A faixa de pH especificada para a formulação final para ONS-5010 é 5,9-6,3. Foi observado durante o desenvolvimento do ONS-5010 que os valores de pH próximos de 6,2 e além apresentam um aumento contínuo no % de HMWS. Além disso, o bevacizumabe exibe um fenômeno adicional de "agregação reversível". Uma parte do

% total de espécies de HMWS presentes na substância de fármaco ao longo do tempo na condição de armazenamento prescrita (2-8 °C) prosseguirá para um estado agregado até que um equilíbrio seja alcançado. Isso representa uma preocupação adicional em relação ao prazo de validade da substância de fármaco ou produto no armazenamento. Portanto, o desenvolvimento do processo de fabricação para ONS-5010 foi projetado principalmente em torno da compreensão e manutenção de uma quantidade aceitável do % de HMWS por toda a parte. Os exemplos abaixo detalham o desenvolvimento da operação da unidade final no processo de fabricação a jusante; ultrafiltração/diafiltração (UF/DF) seguida de formulação e filtração final.

Exemplo 5: UF/DF convencional

[00206] Uma série de experimentos foi realizada para determinar o método de processamento mais eficaz. Um conjunto inicial de experimentos foi realizado para determinar se um processo de UF/DF convencional no qual ONS-5010 foi concentrado e diafiltrado no Tampão de Formulação Final (FFB) seria viável. As condições são mostradas na Tabela 19.

Tabela 19. Variáveis de Processo e Resultados Analíticos para um Processo de TFF Convencional

	Parâmetros	Condição (N=3)
Condições	Tipo de Membrana	Celulose Regenerada, PES
	Corte da Membrana	30 kD
	Carga de Massa (g/m ²)	100 – 150
	Tampão de Diafiltração	FFB, FFB + 0,02 % (v/v) PS-20
	Diavolumes	≥ 5
	Concentração de NaCl de Material de Carga (mM)	118 – 237
Procedimento	Concentração de ONS-5010 na Diafiltração (g/L)	12 – 30
Parâmetros de Operação (Diafiltração)	TMP	14 – 16
	Fluxo de Alimentação (LMH)	240 – 720
	Taxa de Fluxo Cruzado (LMH)	198 – 645

Tabela 20: Resultados Analíticos para um Processo Convencional de TFF

Intermediário	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
Material de Carga	2,34	1,05	1,14
BDS	5,73	5,29	4,68
Δ HMWS %	+ 3,39	+ 4,24	+ 3,54

[00207] A maior parte do aumento de HMWS foi observada durante a diafiltração (Figura 6 e Tabela 20). Nesta etapa, o material que estava originalmente em uma solução de acetato com um pH de 5,0 e condutividade de 25 mS/cm foi permutado para o Tampão de Formulação Final, que tinha um pH de 6,1 e condutividade de cerca de 3,7 mS/cm.

Efeitos do pH e da Condutividade na Agregação

[00208] Um experimento foi realizado para analisar o impacto do pH e da condutividade, usando as condições operacionais na Tabela 21. O material inicial foi concentrado até aproximadamente 30 g/L e uma alíquota foi retirada para titulação para um pH final de 6,1 usando fosfato de sódio a 0,5 M, pH 8,0 (Figura 7). Isso aumentou o pH, embora tenha um impacto desprezível na condutividade, resultando em um aumento de HMWS de aproximadamente 2,2 %. O concentrado restante foi diafiltrado em 6 % (m/v) de trealose em água, resultando em uma diminuição na condutividade de 25 mS/cm para aproximadamente 1 mS/cm sem alteração significativa no pH. Os níveis de agregado permaneceram inalterados (Figura 8; pontos de dados 1 e 2), estabelecendo que quando a condutividade muda durante a diafiltração e o pH permanece constante, a HMWS não é impactada. O material recuperado da etapa UF/DF em 6 % (p/v) de trealose foi posteriormente diluído até a concentração final de proteína e teor de fosfato usando fosfato de sódio 0,5 M em 6 % (p/v) de α,α' -trealose e FFB sem PS-20 para atingir uma concentração proteica aproximada de 25 g/L e mola-

ridade de fosfato de 51 mM. Durante essas adições, a HMWS aumentou 1,64 % (Figura 8), o que se correlaciona com o aumento de HMWS observado durante o ajuste do pH da alíquota removida após a concentração (Figura 7). Polissorbato-20 foi adicionado para atingir uma concentração final de 0,04 % (v/v) e não resultou em um aumento na agregação. Por último, a BDS foi filtrada por 0,2 µm usando uma unidade de filtração a vácuo, o que causou um aumento adicional na agregação de 0,50 %. Este experimento demonstrou que a causa raiz da maioria do aumento de HMWS durante a etapa de UF/DF resulta da mudança no pH do material.

Tabela 21. Variáveis de Processo e Resultados Analíticos para Diafiltração em α,α' Trealose

	Parâmetros	Experimento de Diafiltração em α,α' Trealose
	Lote #	B140101/03-D14
Condições	Tipo de Membrana	PES, 30 kD
	Carga de Massa (g/m ²)	150
	Tampão de Diafiltração	6 % (p/v) de α,α' Trealose em água
	Diavolumes	5,3
	Material de Carga	Líquido
Parâmetros de Operação (Diafiltração)	TMP (psi)	15
	Fluxo de Alimentação (LMH)	576
	Taxa de Fluxo Cruzado (LMH)	530

Tabela 22: Resultados de SEC-HPLC para Diafiltração em α,α' Trealose

Intermediário	Diafiltração em α,α' Trealose
Material de Partida	1,57
BDS pré-filtrada	3,02
BDS	3,14
Δ HMWS %	1,95

Exemplo 6: Duas Etapas de Diafiltração

[00209] Um experimento foi projetado com duas etapas de diafiltração para determinar se uma mudança imediata de pH se provaria mais robusta do que o aumento gradual visto no processo convencional de UF/DF. Três condições foram testadas (Tabela 22). No primeiro, um pico de fosfato foi administrado após dois diavolumes de 6 % (p/v) de α,α' -trealose em água, e foi seguido por 5 diavolumes de FFB, sem PS-20. Isso permitiu uma mudança imediata de pH (através do pico), mas com mais diafiltração que deve resultar em um pH e concentração de fosfato robustos e reproduzíveis. Na segunda condição, a segunda etapa de diafiltração foi realizada em Fosfato de Sódio Monobásico 42 mM, Fosfato de Sódio Dibásico 2 mM, 6 % (p/v) de α,α' -Trealose (pH 5,5). O Fosfato de Sódio Dibásico restante foi adicionado após a recuperação para ajustar o pH ao alvo. Finalmente, uma condição foi testada em que 2 diavolumes de 6 % (p/v) de α,α' -trealose em água foram seguidos com 5 diavolumes de FFB. Os resultados são mostrados na Tabela 23.

Tabela 23. Variáveis do Processo: Duas Etapas de Diafiltração

Parâmetros	Condição 1	Condição 2	Condição 3
Procedimento	Ajustar após 2 DV em 6 % de α,α' -Trealose, siga com 5 DV em FFB	2 DV em 6 % de α,α' -Trealose + 5 DV em fosfato de sódio + Ajuste dibásico depois da recuperação	2 DV em 6 % de α,α' -Trealose, siga com 5 DV em FFB
Número de Ciclos	1	1	2
Condições			
Membrana	PES		
Área da Superfície (m ²)	0,02		0,3
Carga de massa (g/m ²)	200	200	200
Tampão #1	6 % (p/v) de α,α' -Trealose em água		
Diavolumes	2,7	2,1	2,3 – 2,4
Tampão #2	FFB sem PS-20	Fosfato de Sódio Monobási-	FFB sem PS-20

		co a 42 mM, Fosfato de Sódio Dibásico a 2 mM, 6 % (p/v) de α,α -Trealose	
Diavolumes	5,1	5,2	5,0 – 5,4
Solução de Ajuste	0,51 M de Fosfato de sódio pH 5,74	Fosfato de Sódio Sólido Dibásico	N/A
Parâmetros de Operação de Diafiltração			
TMP	15		
Fluxo de Alimentação (LMH)	240		

Tabela 24. Resultados de SEC-HPLC: Duas Etapas de Diafiltração

Intermediário	Condição 1		Condição 2	Condição 3
Carga	0,82		1,17	1,17
BDS	2,58	2,60	3,18	2,86
Δ HMWS %	1,76	1,78	2,01	1,69

[00210] Todas as três condições resultaram em um aumento significativo na HMWS % que, embora menor do que no experimento de UF/DF convencional, indicou que qualquer diafiltração realizada em fosfato de sódio resulta em um aumento na HMWS %. Com base nos resultados deste experimento, todos os experimentos adicionais foram realizados usando 6 % (p/v) de α,α -trealose em água para a diafiltração com a adição de fosfato e polissorbato-20 após a recuperação para ajustar o retentado na formulação de BDS (5,8 g/L de monohidratado de fosfato de sódio monobásico,, 1,2 g/L de fosfato de sódio dibásico, anidroso, 60 g/L de α,α -trealose, 0,04 % de polissorbato 20, pH 6,1).

Exemplo 7: Impacto do pH Final nos Níveis de HMWS na BDS

[00211] A fim de confirmar o impacto do pH final nos níveis de HMWS na BDS, foi realizado um experimento no qual a diafiltração foi realizada em 6 % de α,α -trealose em água e o retido recuperado foi ajustado para pH 5,5, 5,7, 5,9 e 6,1. Fosfato de sódio (0,5 M, pH 9),

HEPES 2M, pH 9 e NaOH 1N foram usados para ajustar o pH para ver se a solução teve um impacto próximo a HMWS %, ou se o pH foi o único condutor do aumento em HMWS % (Figura 9).

[00212] Os resultados na Figura 9 confirmam que o pH da BDS teve um impacto substancial na HMWS %, com HMWS % mais alta conforme o pH aumenta. Os componentes da solução não parecem ter um impacto na HMWS %, evidência adicional de que o pH foi o principal fator para o aumento do HMWS %.

Exemplo 8: Impacto da concentração de proteína durante o ajuste de pH em HMWS %

[00213] Um experimento foi realizado para determinar se a concentração de proteína durante o ajuste de pH teve um impacto na HMWS %. A diafiltração foi realizada em 6 % de α,α -trealose em água. Após a recuperação, o retido foi diluído para 25, 28 ou 30 g/L usando 6 % de α,α -trealose em água. As porções de 25 g/L e 30 g/L foram então divididas em três alíquotas e o fosfato foi ajustado. A porção de 28 g/L foi dividida em quatro alíquotas; três foram submetidos a ajuste de fosfato normal, mas o quarto foi realizado pela adição de fosfato de sódio monobásico em pó e fosfato de dissódio para atingir uma concentração final de fosfato de sódio de 51 mM, pH 6,0.

[00214] Os resultados na Figura 10 mostram que não houve impacto na HMWS % quando a concentração do retentado ONS-5010 recuperado variou de 30 - 25 g/L. Os resultados para a concentração de 28 g/L indicaram adicionalmente que a composição do pico de fosfato não pareceu impactar o nível de HMWS %.

Exemplo 9: Processo de UF/DF Final

[00215] Três ciclos foram realizados para confirmar o processo atualizado na escala do modelo de 0,02 m² usando os parâmetros descritos na Tabela 27 e o processo descrito na Figura 11. Os componentes de fosfato de sódio e polissorbato foram adicionados por meio das

Equações 1 - 4. Os resultados dos três ciclos são mostrados na Tabela 26. Os resultados dos ciclos de confirmação foram positivos. A solução final continha 5,83 g/L de fosfato de sódio monobásico e 1,22 g/L de fosfato de sódio dibásico. A concentração final de fosfato em todos os ciclos foi de 51 mM e a concentração final de Polissorbato-20 em todas os ciclos foi de 0,04 % em v/v. O HMWS % foi maior em todos os casos do que estudos anteriores, devido a uma mudança nos ensaios para medir o agregado reversível e irreversível. O pH, condutividade, concentração e HMWS % foram extremamente consistentes nos três ciclos, indicando que o processo de UF/DF era robusto e reproduzível.

Tabela 25. Parâmetros de Processo para UF/DF e Carga de BDS

Descrição da Etapa	Parâmetro do Processo	Alvo	Intervalo
Preparação de Membrana	Tamanho do Poro da Membrana (kDa)	30	
	Tipo de membrana	PES	
	Volume de equilíbrio (L/m ²)	5	NA
Ultrafiltração	Carga de Membrana (g/m ²)	NA	≤500
	Taxa de fluxo de alimentação (todas as operações) (LMH)	375	≤450
	Pressão do Retentado (psi)	5	≤ 25
	TMP de Operação (todas as operações) (psig)	15	≤ 20
	concentração final de UF (g/L)	35	30 – 40
Diafiltração	Solução	6 % (p/v) de α,α'-Trealose em água	
	Volumes de diafiltração	5	≥ 5
Concentração-Despolarização	P _F de Recirculação (psig)	NA	≤ 30
	Tempo de Recirculação (min)	10	≤ 60
	P _F de Estímulo de Tampão (psig)	NA	≤ 30
	Tempo de Estímulo de Tampão (min)	10	≤ 60
	Preajuste da concentração de proteína (g/L)	35	30 – 40
	Volume de Chase de Fluxo de Tampão (mL)	Calculado para obter a concentração de proteína de 30 ± 1,5 g/L	
Adição de Fosfato de sódio e Polissorbato 20	Concentração de proteína (g/L), pós-ajuste	25	22,5 – 27,5
	pH do Permeado/Retentado Final	6,2	5,9 – 6,3
	cond. do Permeado/Retentado Final	3,5	3,5 ± 1

	(mS/cm)		
Filtração e Carga Final	Filtro de Profundidade Pós-Concentração	MCE/Borosilicate Glass ^a	
	Capacidade do Filtro de Profundidade Pós-Concentração (L/m ²)	25	≤ 25
	Material de Membrana do Filtro Terminal	PVDF	
	Membrana do Filtro Terminal (L/m ²)	50	≤ 50
	Fluxo (LMH)	300	≤ 300
Tempo de Manutenção para BDS	Armazenamento de Curto Prazo	≤ 60 days at 5 ± 3°C	
	Armazenamento de Longo Prazo	Deve ser armazenado a – 20 ± 5 °C dentro de 60 dias a partir da data de fabricação	
Rendimento esperado da etapa (%)		≥ 95	≥ 90

^a O meio do filtro foi ésteres de celulose mistos com um pré-filtro usando borossilicato vitrificado

Equação 1: Cálculo para Adição de Fosfato de Sódio

$$V_{\text{estoque de Fosfato de Sódio a 0,51M}} = \frac{V_i}{9}$$

- V_i = o volume de retentado recuperado da UF/DF

Equação 2: Cálculo para Adição de Polissorbato-20

$$V_{\text{estoque de PS-20 10\%}} = \frac{V_{ii}}{249}$$

- V_{ii} = o volume de retentado recuperado após a adição de solução de estoque de fosfato de sódio a 0,51 M

Equação 3: Determinação do Volume Final

$$V_{\text{final}} = \frac{C_{iii} V_{iii}}{25}$$

- V_{final} = o volume total necessário para atingir a concentração de proteína alvo de 25 g/L (L).
- C_{iii} = a concentração do material recuperado após a adição de Fosfato de Sódio 0,51 M e Solução de Estoque de Polissorbato 20 (g/L).
- V_{iii} = o volume do material recuperado após a adição da solução-mãe de Fosfato de Sódio 0,51 M e Polissorbato 20 e imedia-

tamente antes da diluição (L).

Equação 4. Cálculo para adição de diluente de concentração de proteína

$$V_{FFB}(\text{sem PS-20}) - V_{FFB}(\text{no PS-20}) = V_{final} - V_{iii}$$

- $V_{FFB}(\text{com PS-20})$ = Volume de tampão de formulação final com PS 20 0,04 % (m/v) necessário para diluir a concentração de proteína até 25 g/L e para atingir V_{final} calculado na Equação 3 (L).

- V_{final} = o volume total calculado na Equação 3 (L).

- V_{iii} = o volume do material recuperado após a adição da solução-mãe de Fosfato de Sódio a 0,51 M e Polissorbato 20 e imediatamente antes da diluição (L).

Tabela 26: Resultados dos ciclos de confirmação da UF/DF

Atributo	Especificação	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
pH	5,9 - 6,3 (6,2)	6,0	6,0	6,0
Condutividade (mS/cm)	N/A	3,98	3,88	3,84
[Proteína] (mg/mL)	23-27,5 (25)	25,2	24,6	24,9
Métodos de SEC-HPLC	TM-0026 (pico principal) e TM-0033 (HMWS)			
Pico Principal % (monômero)	≥ 95	98,5	98,6	98,5
HMWS %	≤ 5	4,5	4,6	4,7
Met258	≤ 2	1,3	1,2	1,3

Tabela 27: Parâmetros para os Ciclos de Confirmação de UF/DF

Parâmetros	Valores
Membrana	PES (Pall Centramate Omega)
Área da superfície (m ²)	0,02
Carga de massa (g/m ²)	200
Tampão de diafiltração	6 % (p/v) de α,α-Trealose em água
Diavolumes	5
fluxo de alimentação (LMH)	240
TMP (psi)	15

[00216] O processo descrito na Tabela 27 mostrou ser um processo robusto e reproduzível, embora com uma baixa carga de membrana e taxa de fluxo de alimentação. A carga da membrana é um fator do

tempo de processo desejado e do fluxo de permeado (volume de permeado ao longo do tempo). O fluxo de permeado é influenciado pela taxa de alimentação (LMH), pressão de retentado/pressão de transmembrana e a viscosidade do material. A fim de determinar as condições ideais necessárias para a quantidade máxima de material na área mínima da membrana em um período de tempo razoável, dois experimentos de otimização foram realizados. O primeiro era determinar o impacto do fluxo e da taxa de fluxo na qualidade do produto (conforme determinado pelo aumento em HMWS %), e o segundo era determinar uma carga de membrana aceitável para o processo.

Exemplo 10: Impacto do Fluxo e da Taxa de Alimentação na Qualidade do Produto

[00217] Taxas de fluxo foram obtidas para taxas de alimentação de 100, 200, 300, 400 e 500 LMH em pressões de retido de 0, 5, 10, 15, 20 e 1,76 kg/cm² (25 psi). O controle da pressão do retentado foi escolhido em vez da TMP, pois a TMP foi determinada pela pressão do retentado. Os parâmetros experimentais são mostrados na Tabela 28. Os resultados são mostrados nas Figuras 12 - 14. A Figura 12 mostra as curvas de fluxo de permeado inicial vs. pressão de retentado para cinco taxas de fluxo de alimentação na concentração inicial de ONS-5010. A Figura 13 mostra as curvas de pressão de fluxo vs. retentado para cinco taxas de fluxo de alimentação, também na concentração inicial de ONS-5010. A Figura 14 mostra as curvas de pressão de fluxo vs. retentado para cinco taxas de fluxo de alimentação com ONS-5010 concentrado a aproximadamente 50 g/L. A experiência indicou que o fluxo de permeado não aumentou significativamente com pressão de retentado adicional em qualquer uma das condições testadas; portanto, a pressão do retentado foi ajustada em 0,35 kg/cm² (5 psi).

Tabela 28: Impacto do Fluxo e Experimento de Taxa de Alimentação

Parâmetros	Valores		
Membrana	PES (Pall Centramate Omega)		
Área da superfície (m ²)	0,1		
Carga de massa (g/m ²)	200		
Concentração Inicial (g/L)	2,3 g/L		
Concentração Final (g/L)	50 g/L		
Tampão de diafiltração	6 % (p/v) de α,α -Trealose em água		
Diavolumes	5		
Taxa de Fluxo (LMH)	300	375	450
Pressão do Retentado (psi)	5		

Exemplo 11: Impacto da Concentração no Processo de Diafiltração

[00218] A concentração ideal para diafiltração (DF) é tipicamente aquela que permite o menor volume com o maior fluxo de permeado. O parâmetro de otimização para DF é determinado multiplicando a concentração pelo fluxo de permeado. O número máximo obtido é a concentração ideal para realizar a UF/DF. A Figura 15 demonstra que na faixa testada, a concentração não afetou o fluxo de permeado, ou seja, o fator de otimização para DF continuou a aumentar. Portanto, o objetivo anterior de diafiltração a 35 g/L foi mantido. Isso, combinado com o processo de adição de fosfato, resultou em um processo de UF/DF robusto e reproduzível.

Exemplo 12: Determinação da Carga de Membrana Aceitável

[00219] Uma carga de membrana de 500 g/m² foi identificada como um alvo, e o seguinte experimento foi realizado para avaliá-la em múltiplas taxas de fluxo. Eles foram testados em relação à condição de controle. Uma amostra de material após a 5DV UFDF e a descarga do sistema foi adicionada o Fosfato 51 mM e Tween 20 0,04 % de acordo com o processo A,0 e filtrada por seringa antes da análise por SEC-

HPLC (Tabela 30). Conforme mostrado na Tabela 30, a mudança na HMWS não aumentou com o aumento das taxas de fluxo de alimentação e todos os três ciclos eram comparáveis em relação à HMWS com a execução de controle (Execução 4).

Tabela 29: Determinação da Carga de Membrana Aceitável

Parâmetros	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Controle
Membrana	PES (Pall Centramate Omega)			
Área da superfície (m²)	0,02			
Carga de massa (g/m²)	500		200	
Tampão de diafiltração	6 % (p/v) de α,α-Trealose em água			
Diavolumes	5			
Taxa de Fluxo (LMH)	300	375	450	240
Pressão do Retentado (psi)	5		N/A	
TMP (psi)	N/A		15	

Tabela 30: Resultados da determinação da carga de membrana aceitável

Atributo	HMWS			HMWS		LMWS	
Amostra	Início	BDS	Δ	Início	BDS	Início	BDS
Ciclo 1	2,2	6,0	3,8	97,7	93,9	0,05	0,05
Ciclo 2	2,3	6,1	3,8	97,7	93,9	0,05	0,04
Ciclo 3	2,7	6,1	3,4	97,3	93,9	0,05	0,04
Ciclo 4	2,7	6,4	3,7	97,2	93,5	0,06	0,05

Exemplo 13: Estudo Comparativo entre ONS-5010 e Formulações de Avastina

[00220] A potência de ONS-5010 foi comparada a formulações alternativas de bevacizumabe, incluindo Avastina formulada para uso nos EUA e formulado para uso na E.U. A Figura 16 demonstra o perfil de concentração-tempo de ONS-5010, Avastina licenciado nos EUA e Avastina licenciado na E.U. como a média. A linha vertical no tempo zero denota a dosagem. Esses resultados demonstram um alto grau de similaridade entre os três produtos.

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação de anticorpo tamponada caracterizada pelo fato de que compreende um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 para uso no tratamento de um distúrbio ocular em um indivíduo.

2. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o distúrbio ocular é um distúrbio da retina, esclera, vítreo, cristalino, pupila, íris, córnea, coroide, nervo ótico, vasculatura retiniana, corpo ciliar ou ângulo do olho.

3. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o distúrbio ocular é um distúrbio da retina ou da coroide.

4. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o distúrbio ocular da retina ou coroide é degeneração macular relacionada à idade, edema macular, edema macular diabético (DME), retinopatia, retinopatia diabética, degeneração miópica, neovascularização coroidal idiopática, neovascularização coroidal inflamatória, neovascularização retiniana, vasculopatia coroidal poliploide, neovascularização do olho, oclusão da veia retiniana do ramo (BRVO), oclusão da veia retiniana central, coriorretinopatia serosa central, retinite, retinite pigmentosa, doença Stargardt, síndrome de Usher, degeneração retiniana, endoftalmite, vitreorretinopatia exsudativa familiar, telangiectasia justafoveal idiopática, degeneração em treliça, buraco macular, vasculatura fetal persistente, oclusão da artéria retiniana ou retinoblastoma.

5. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o distúrbio ocular da retina ou coroide é degeneração macular relacionada à idade, degeneração macular rela-

cionada à idade úmida ou degeneração macular relacionada à idade neovascular.

6. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o distúrbio ocular da retina ou coróide é degeneração macular relacionada à idade úmida.

7. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o distúrbio ocular da retina ou da coróide é o edema macular.

8. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação de anticorpo tamponada é administrada ao indivíduo por rotina oral, intravenosa, intravítrea, intramuscular, tópica, subcutânea, supracoroidal, via colírio ou via absorção direta através dos tecidos da membrana mucosa.

9. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a formulação de anticorpo tamponada é administrada ao indivíduo por uma injeção intravítrea.

10. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação de anticorpo tamponada é administrada ao indivíduo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 28, 29, 30 ou 31 vezes por mês.

11. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação de anticorpo tamponada é administrada ao indivíduo a cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 semanas.

12. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação de anticorpo tamponada é administrada ao indivíduo por um período de tempo de 4, 8, 16, 24, 36 ou 52 semanas.

13. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação de anticorpo tamponada é

administrada ao indivíduo por um período de tempo que dura 1, 2, 3, 4, 5 ou 10 anos.

14. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação de anticorpo tamponada tem uma meia-vida de 10 a 50 dias.

15. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 10 mg/ml a cerca de 50 mg/ml do anticorpo.

16. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 15 mg/ml a cerca de 35 mg/ml do anticorpo.

17. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 23 mg/ml a cerca de 27 mg/ml do anticorpo.

18. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 24 mg/ml a cerca de 27 mg/ml do anticorpo.

19. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 25 mg/ml a cerca de 26 mg/ml do anticorpo.

20. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende cerca de 25,5 mg/ml do anticorpo.

21. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende cerca de 25 mg/ml do anticorpo.

22. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 30 mM a cerca de 70 mM de fosfato de citrato.

23. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 40 mM a cerca de 60 mM de fosfato de citrato.

24. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 48 mM a cerca de 52 mM de fosfato de citrato.

25. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 49 mM a cerca de 51 mM de fosfato de citrato.

26. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 50 mM a cerca de 51 mM de fosfato de citrato.

27. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 30 mM a cerca de 70 mM de fosfato de sódio.

28. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 40 mM a cerca de 60 mM de fosfato de sódio.

29. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 48 mM a cerca de 52 mM de fosfato de sódio.

30. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 49 mM a cerca de 51 mM de fosfato de sódio.

31. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 50 mM a cerca de 51 mM de fosfato de sódio.

32. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico ou tanto o fosfato de sódio monobásico quanto o fosfato de sódio dibásico.

33. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o tampão compreende cerca de 50 mM de fosfato de sódio.

34. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o tampão compreende cerca de 51 mM de fosfato de sódio.

35. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 120 mM a cerca de 180 mM de trealose.

36. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 140 mM a cerca de 180 mM de trealose.

37. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 150 mM a cerca de 170 mM de trealose.

38. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 157 mM a cerca de 161 mM de trealose.

39. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 158 mM a cerca de 160 mM de trealose.

40. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende cerca de 159 mM de trealose.

41. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende cerca de 160 mM de trealose.

42. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 0,02% (v/v) a cerca de 0,06% (v/v) de polissorbato 20.

43. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 0,03% (v/v) a cerca de 0,05% (v/v) de polissorbato 20.

44. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende cerca de 0,04% (v/v) de polissorbato 20.

45. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação tem um pH de cerca de 5,6.

46. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação tem um pH de cerca de 5,8.

47. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação tem um pH de cerca de 6.

48. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação tem um pH de cerca de 6,1.

49. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o tampão compreende de cerca de 11 mM a cerca de 19 mM de acetato de sódio.

50. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o tampão compreende de cerca de 13 mM a cerca de 17 mM de acetato de sódio.

51. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o tampão compreende de cerca de 13 mM a cerca de 16 mM de acetato de sódio.

52. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o tampão compreende cerca de 15 mM de acetato de sódio.

53. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 165 mM a cerca de 185 mM de sacarose.

54. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 170 mM a cerca de 180 mM de sacarose.

55. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende de cerca de 174 mM a cerca de 176 mM de sacarose.

56. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende cerca de 175 mM de sacarose.

57. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) uma formulação de anticorpo tamponada compreendendo um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; e

b) instruções para administrar a formulação de anticorpo em um método para tratar um distúrbio ocular.

58. Kit, de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o distúrbio ocular é um distúrbio da retina, esclera, vítreo, cristalino, pupila, íris, córnea, coróide, nervo ótico, vasculatura retiniana, corpo ciliar ou ângulo do olho.

59. Kit, de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o distúrbio ocular é um distúrbio da retina ou coróide.

60. Kit, de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o distúrbio ocular da retina ou coróide é degeneração macular relacionada à idade, edema macular, edema macular diabético (DME), retinopatia, retinopatia diabética, degeneração miópica, neovascularização coroidal idiopática, neovascularização coroidal inflamatória, neovascularização retiniana, vasculopatia coroidal poliploide,

neovascularização ocular, oclusão da veia retiniana do ramo (BRVO), oclusão da veia retiniana central, coriorretinopatia serosa central, retinite, retinite pigmentosa, doença de Stargardt, síndrome de Usher, degeneração retiniana, endoftalmite, vitreorretinopatia exsudativa familiar, telangiectasia justafoveal idiopática, degeneração em treliça, buraco macular, vasculatura fetal persistente, oclusão da artéria retiniana ou retinoblastoma.

61. Kit, de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o distúrbio ocular da retina ou coróide é degeneração macular relacionada à idade, degeneração macular relacionada à idade úmida ou degeneração macular relacionada à idade neovascular.

62. Kit, de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o distúrbio ocular da retina ou coróide é degeneração macular relacionada à idade úmida.

63. Kit, de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que as instruções incluem instruções para a administração do anticorpo estável, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 56.

64. Kit, de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um dispositivo para injetar a formulação de anticorpo tamponada selecionada a partir do grupo que compreende: uma seringa, agulha e cateter.

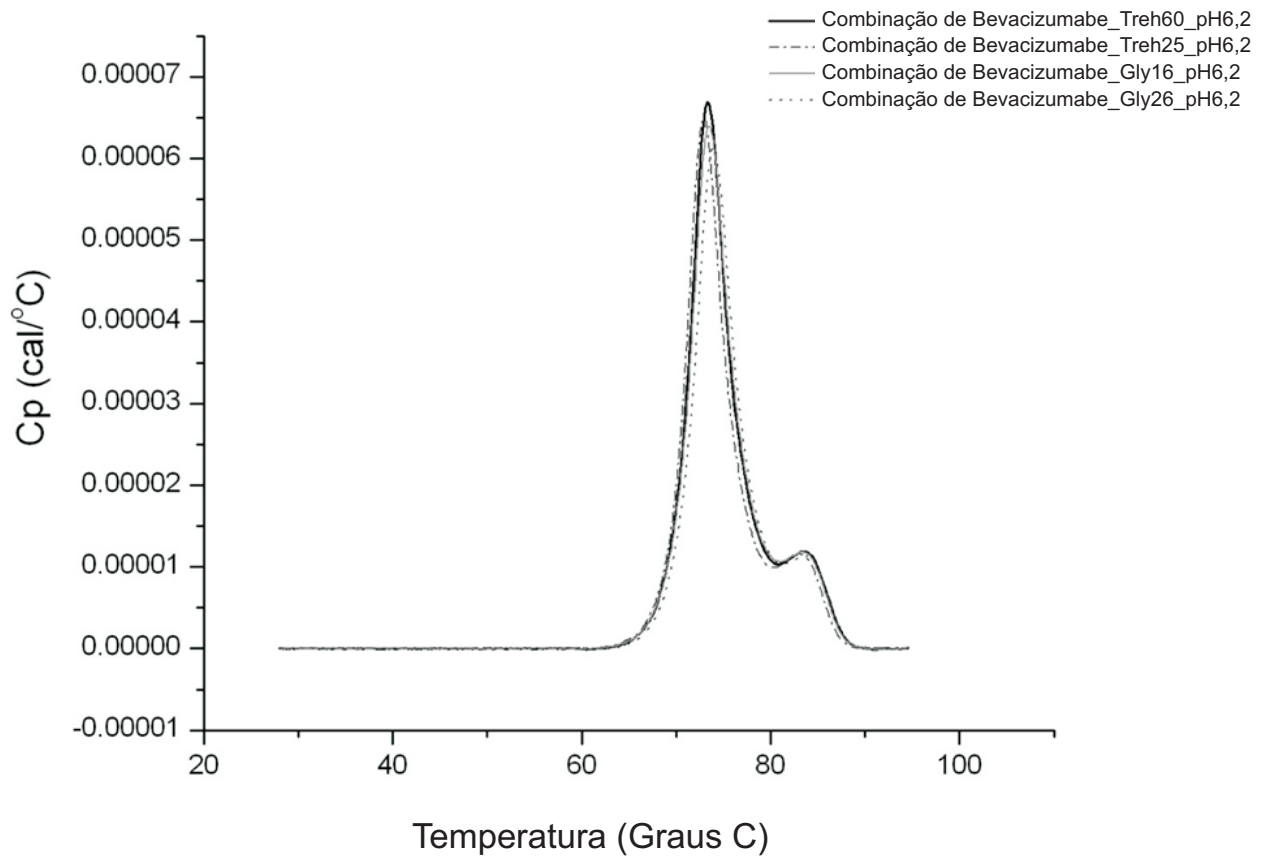


Fig. 1

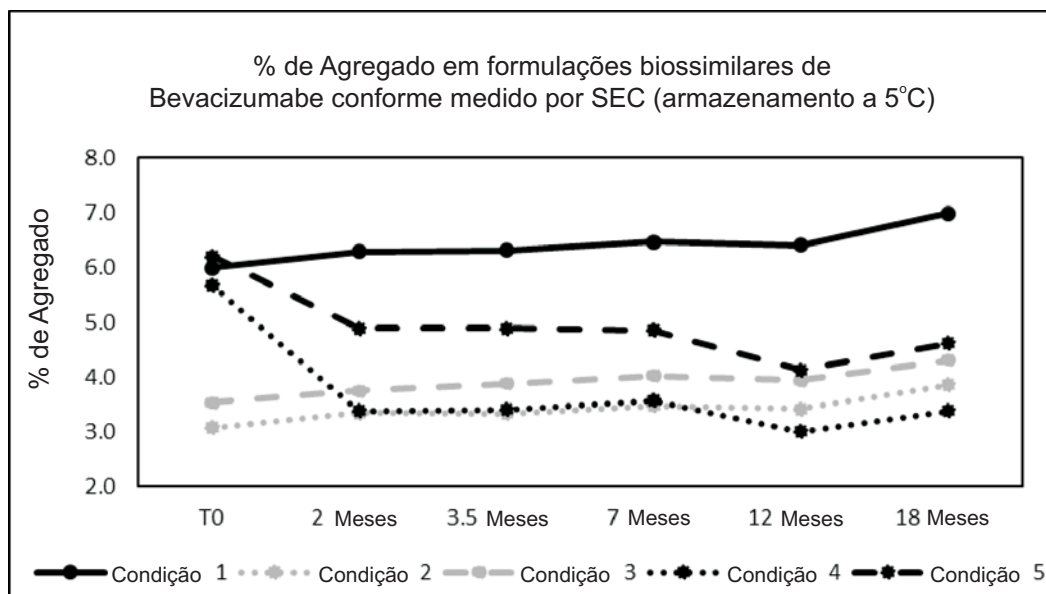


Fig. 2A

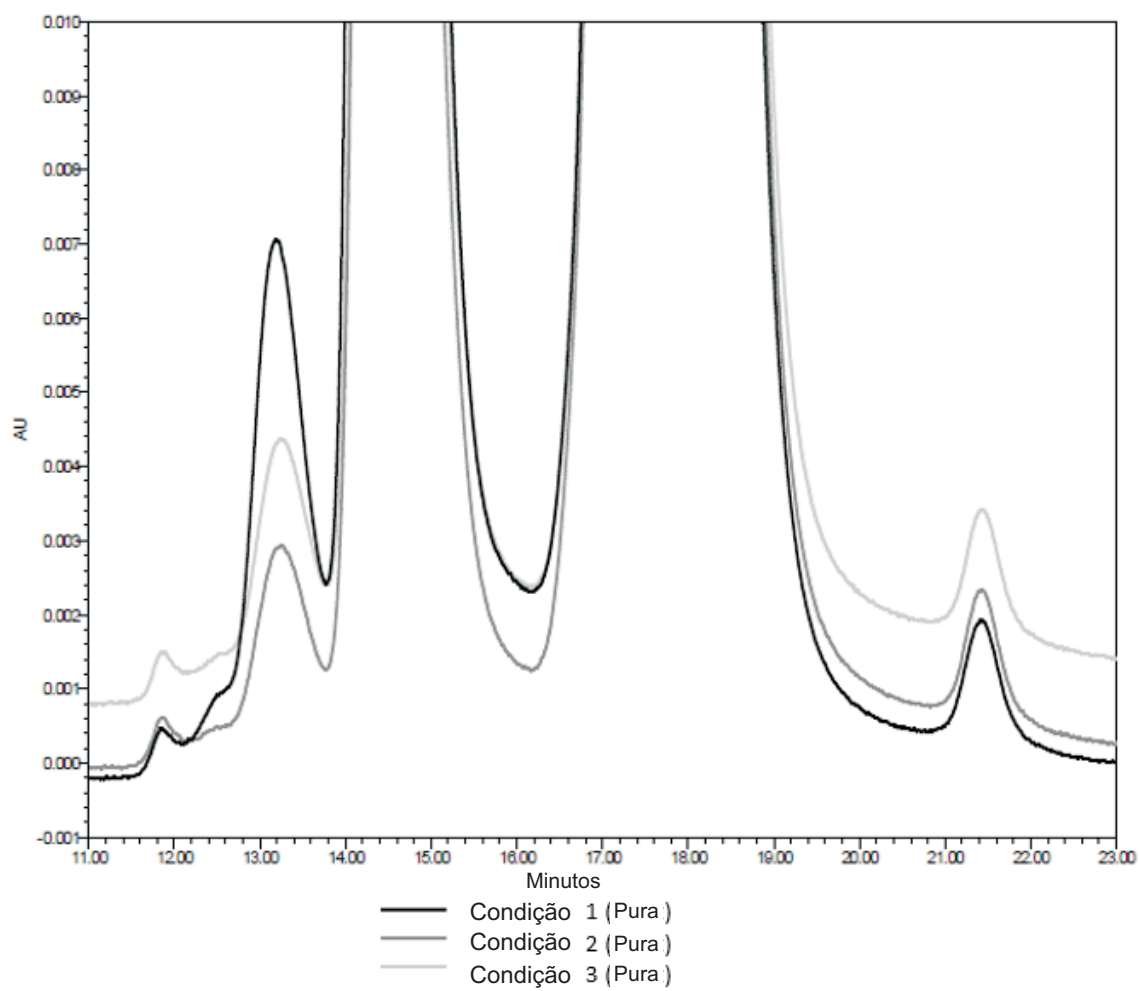


Fig. 2A (i)

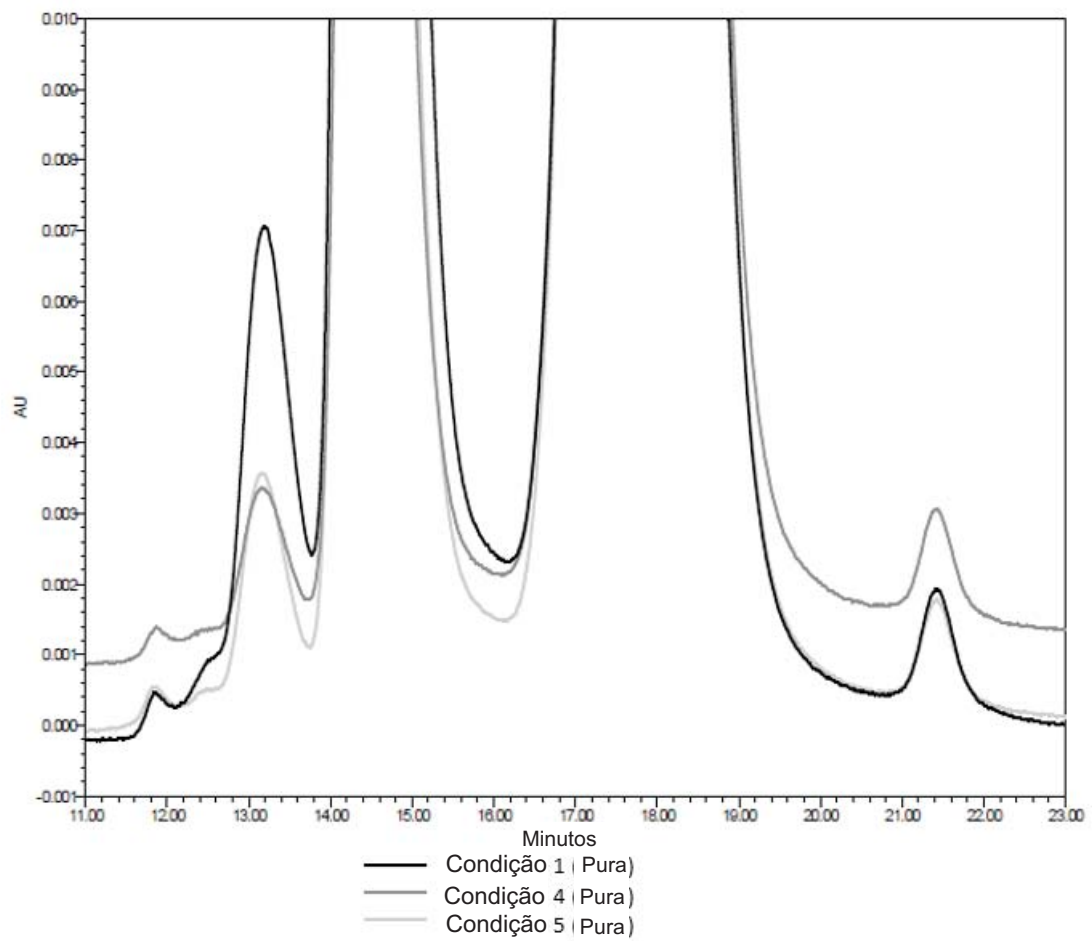


Fig. 2A (ii)

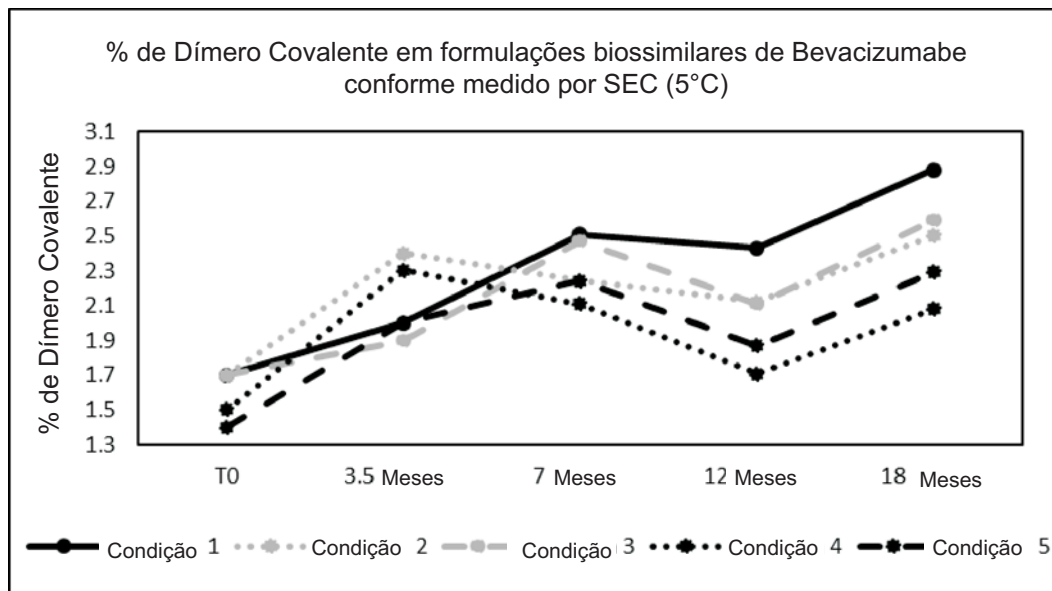


Fig. 2B

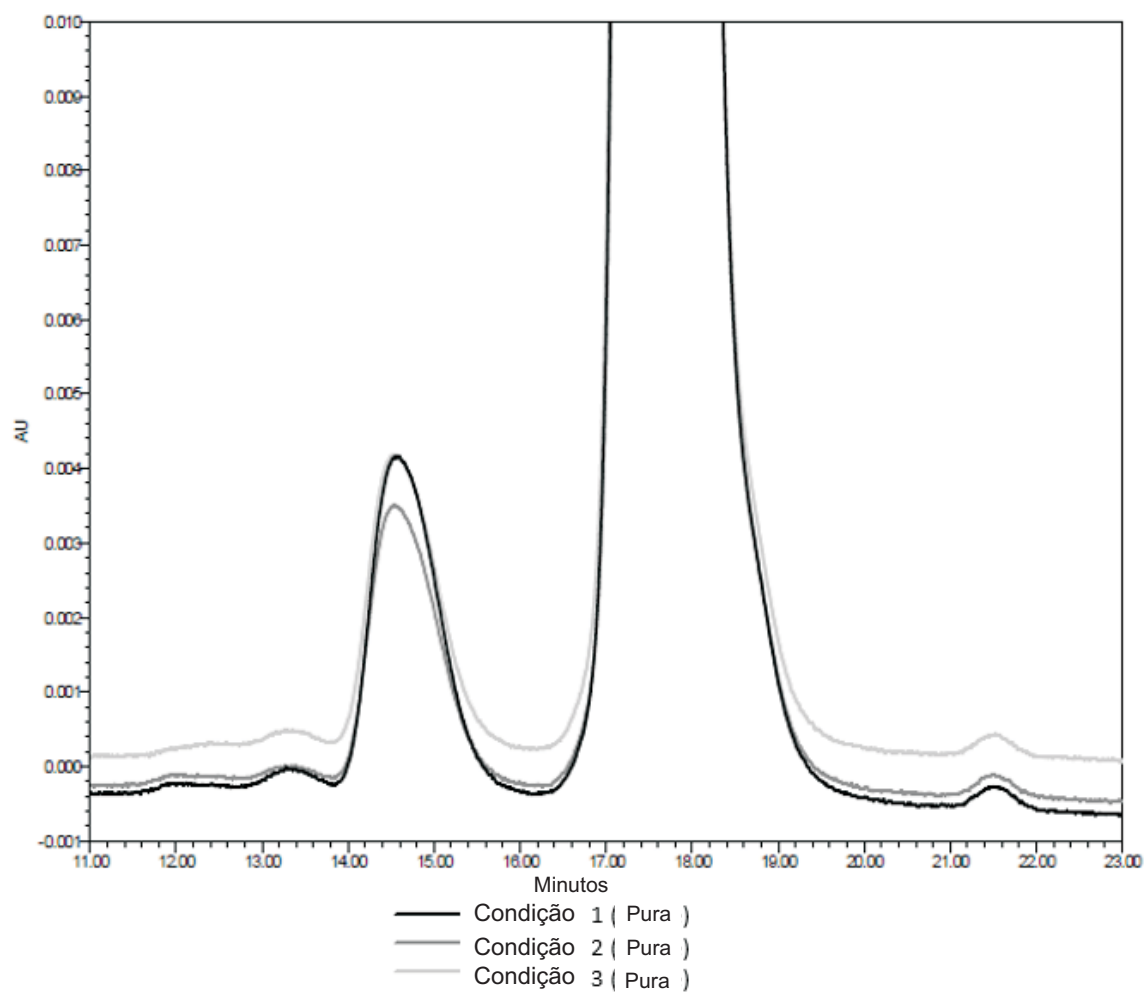


Fig. 2B (i)

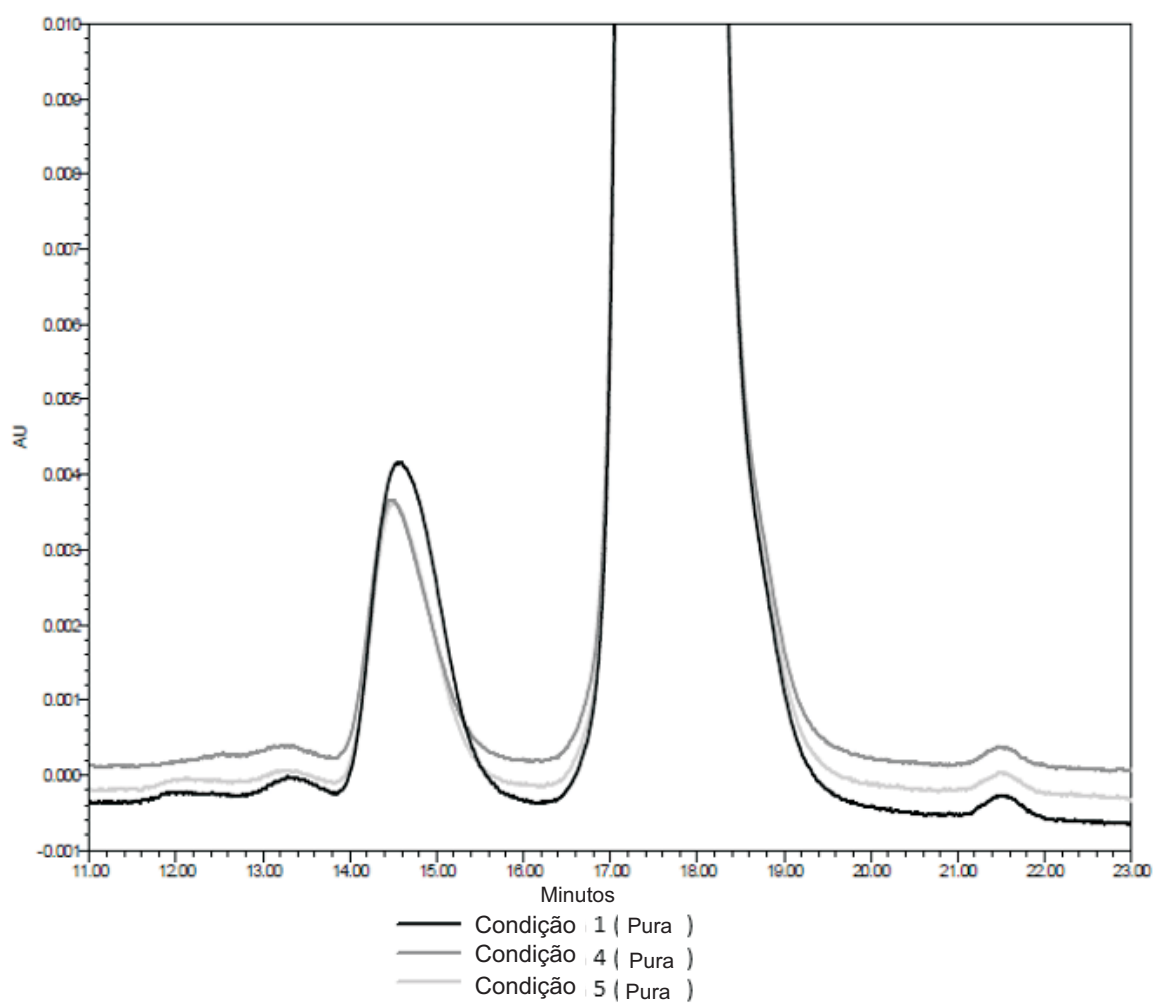


Fig. 2B (ii)

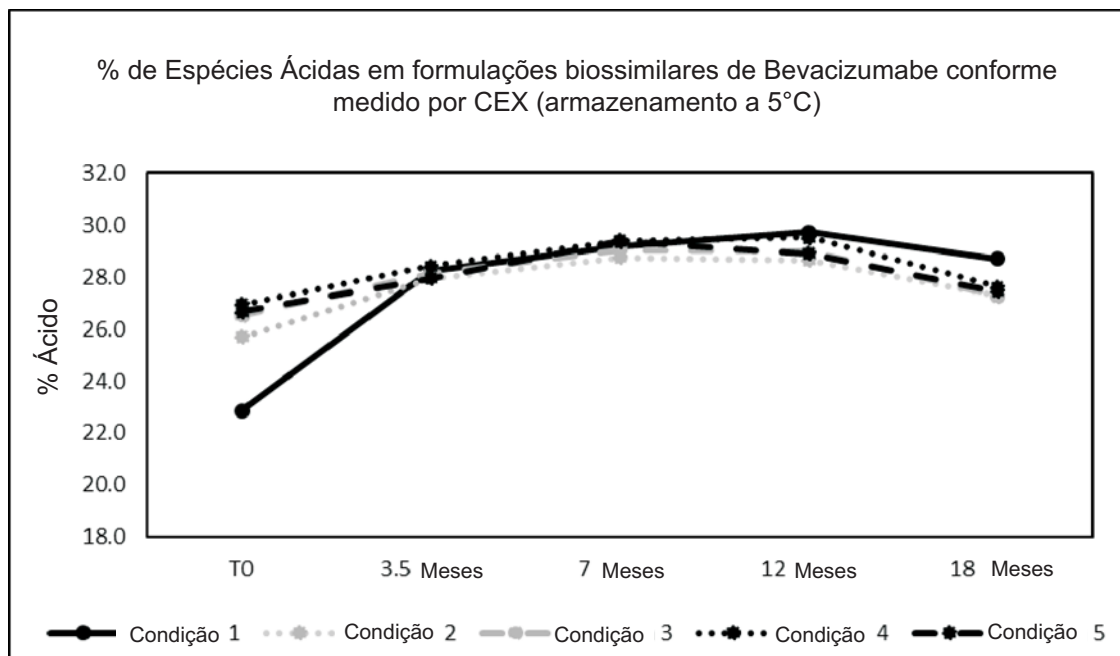


Fig. 2B (iii)

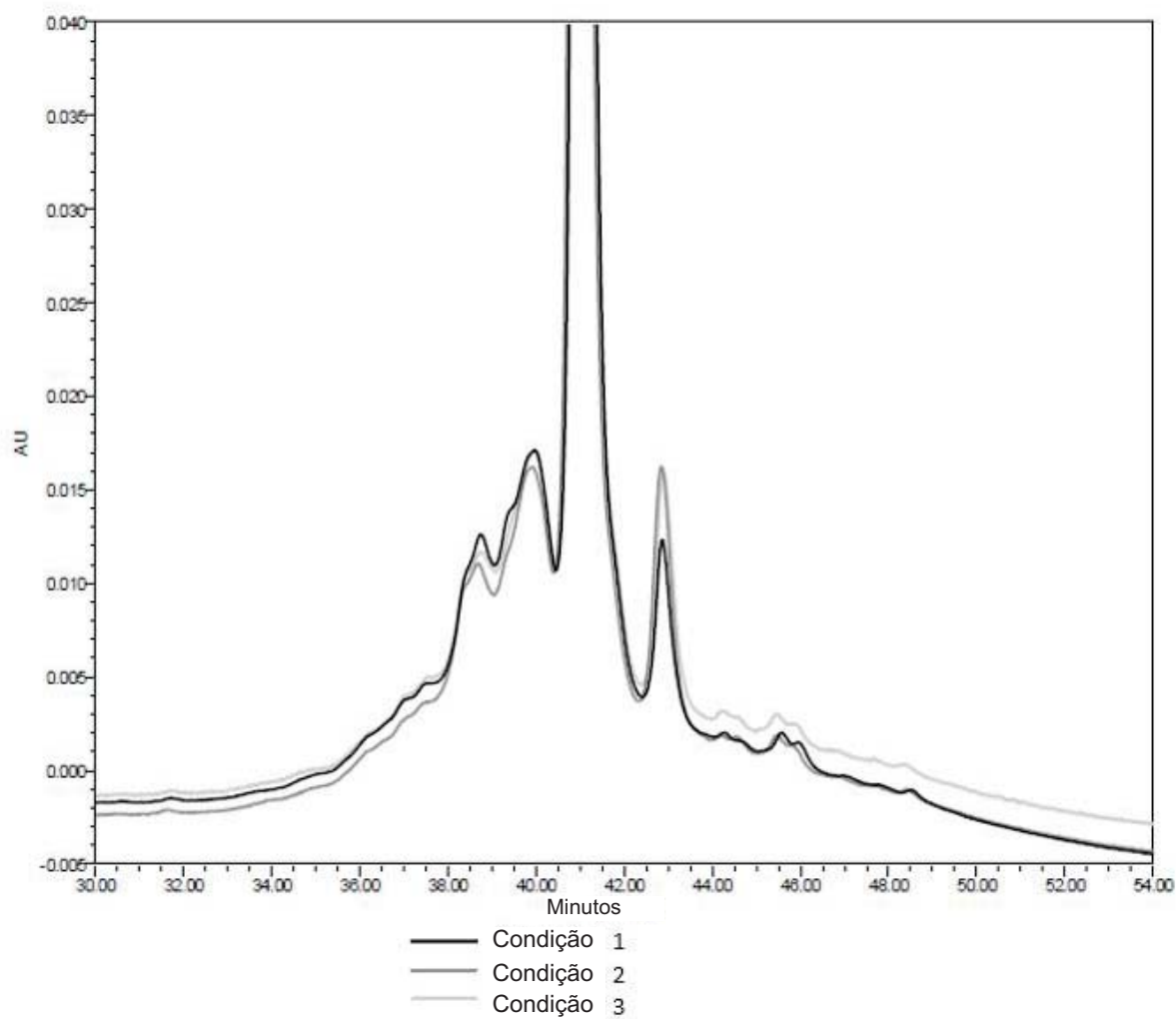


Fig. 2B (iv)

10/29

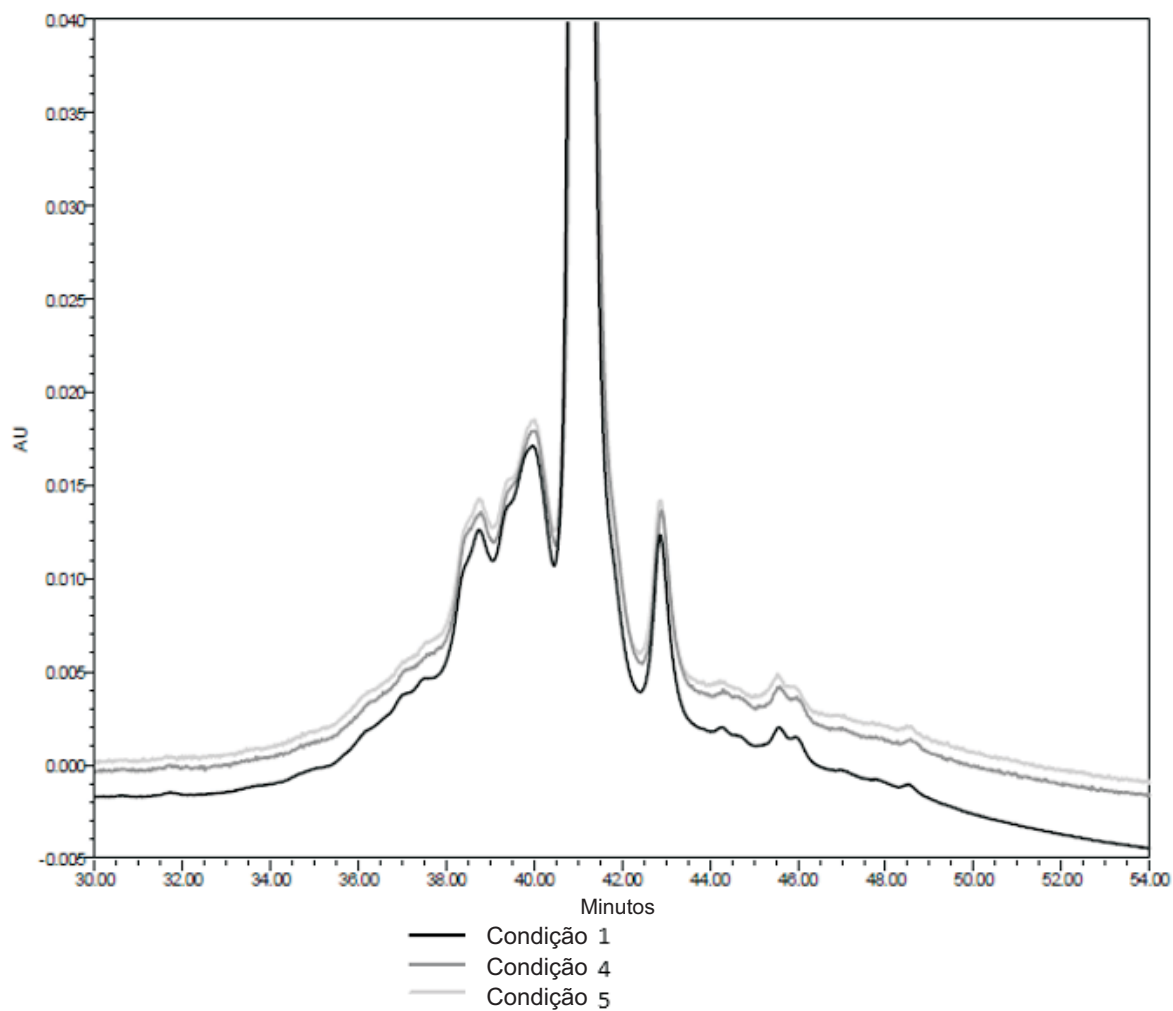


Fig. 2B (v)

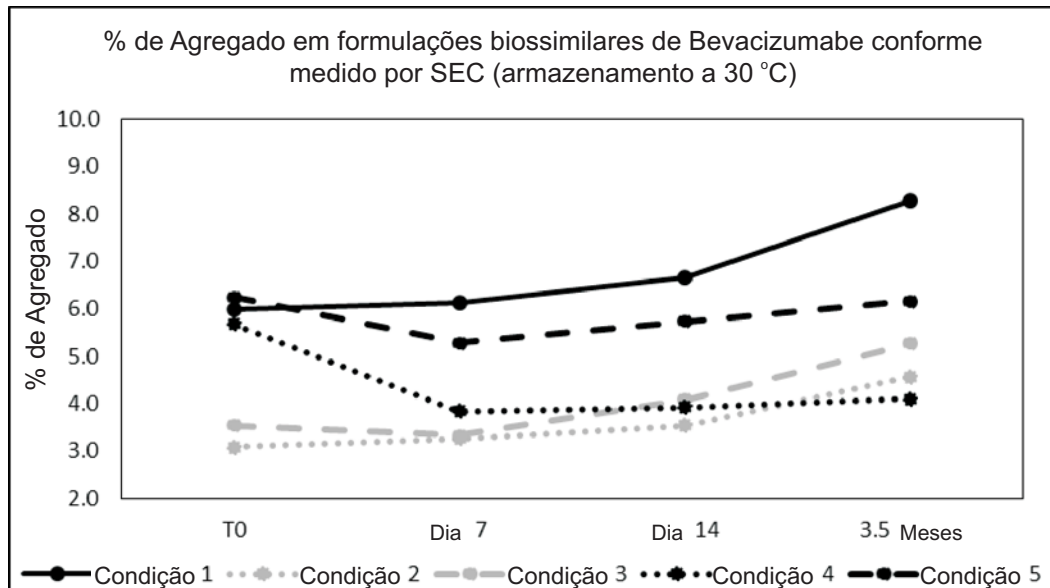


Fig. 2C

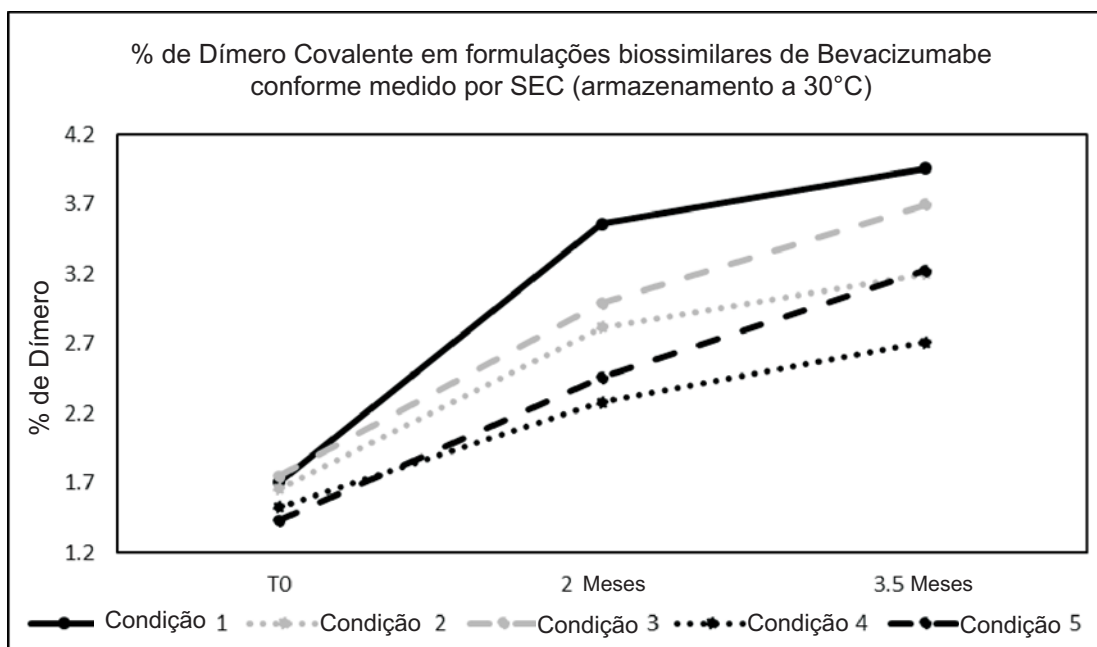


Fig. 2D

12/29

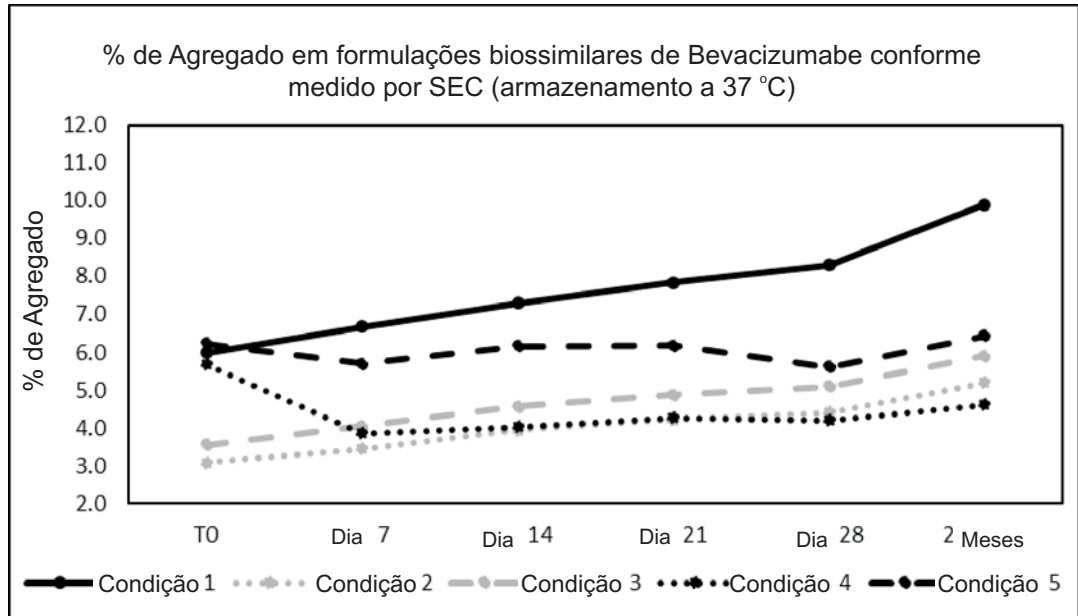


Fig. 2E

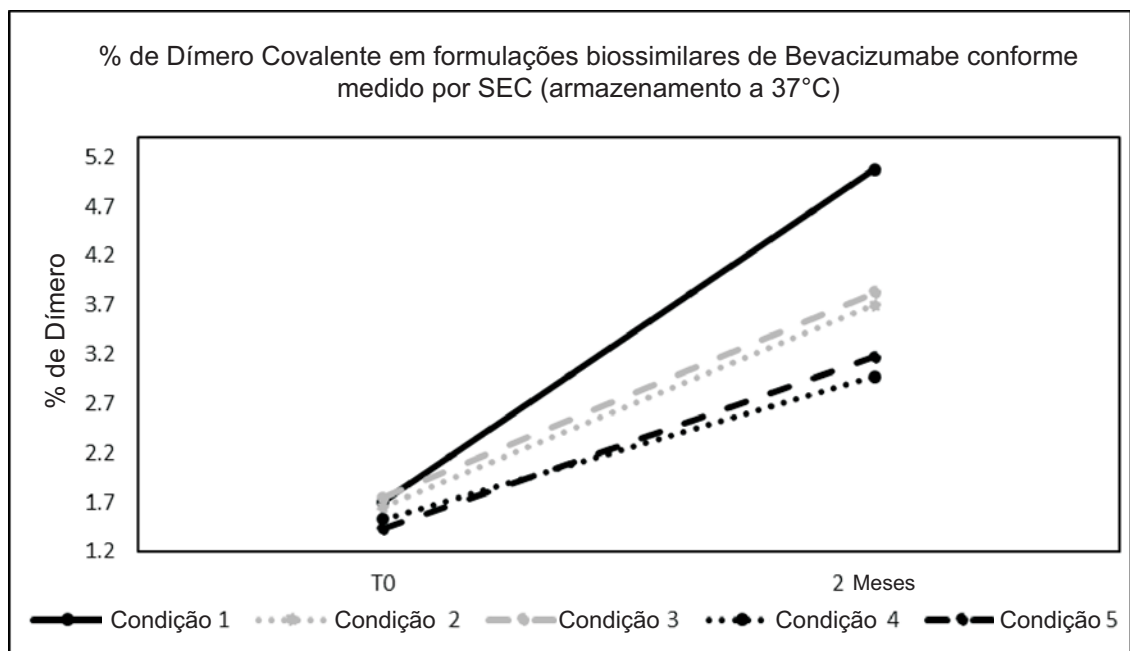


Fig. 2F

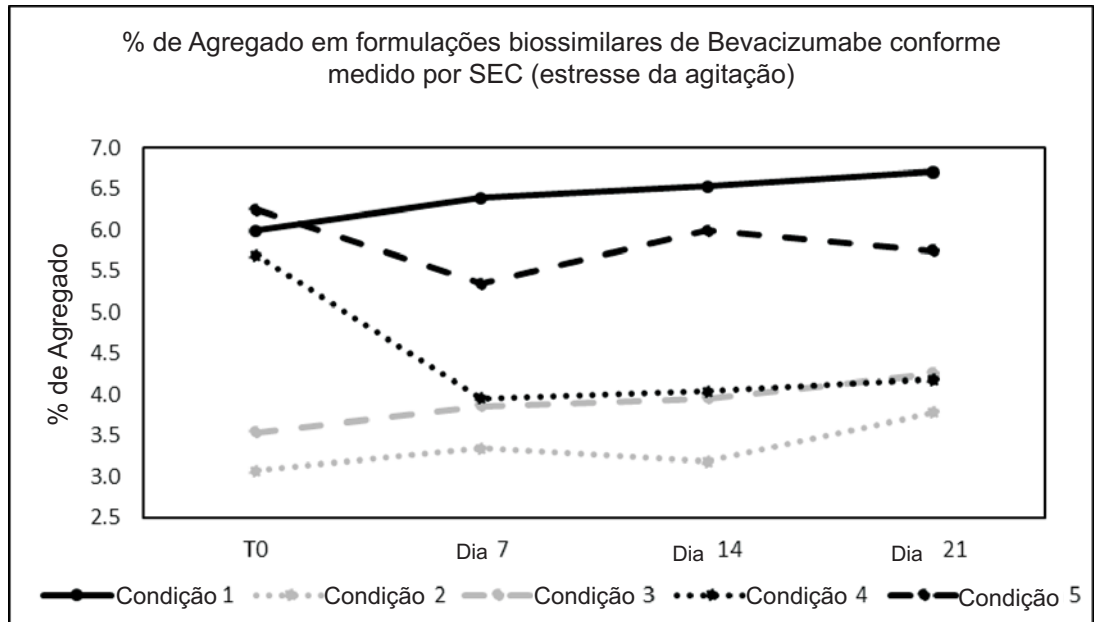


Fig. 2G

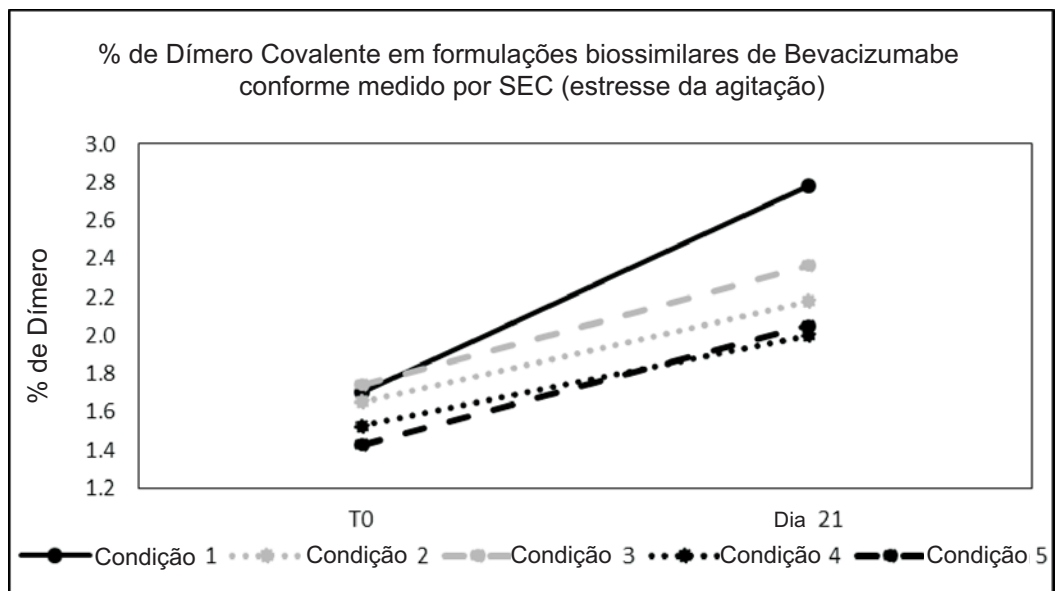


Fig. 2H

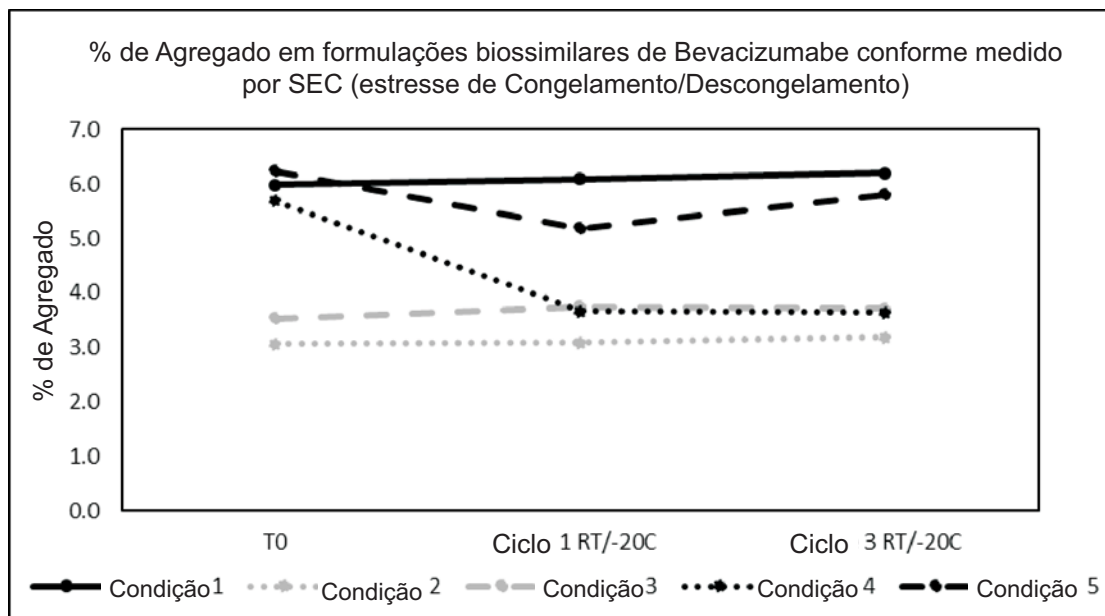


Fig. 2I

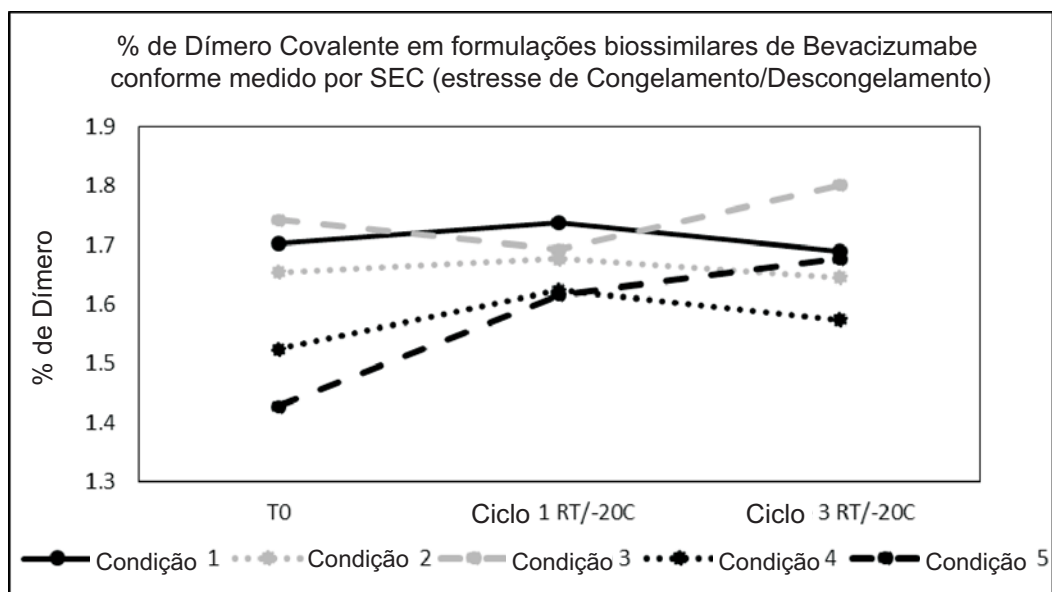


Fig. 2J

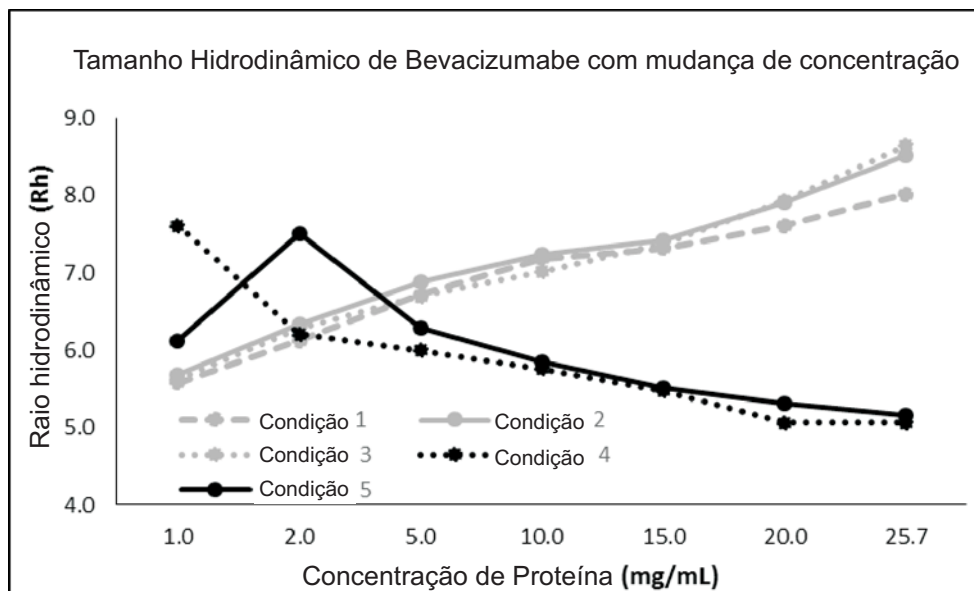


Fig. 3

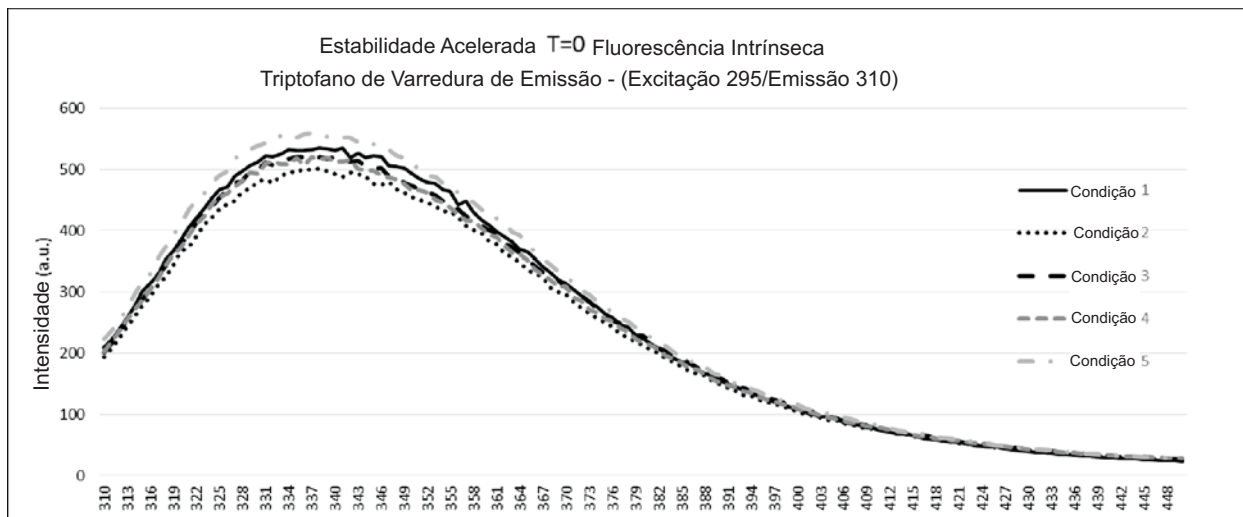


Fig. 4

Fig. 5

Diagrama de Fluxo do Processo do Processo de Fabricação de NOS-5010

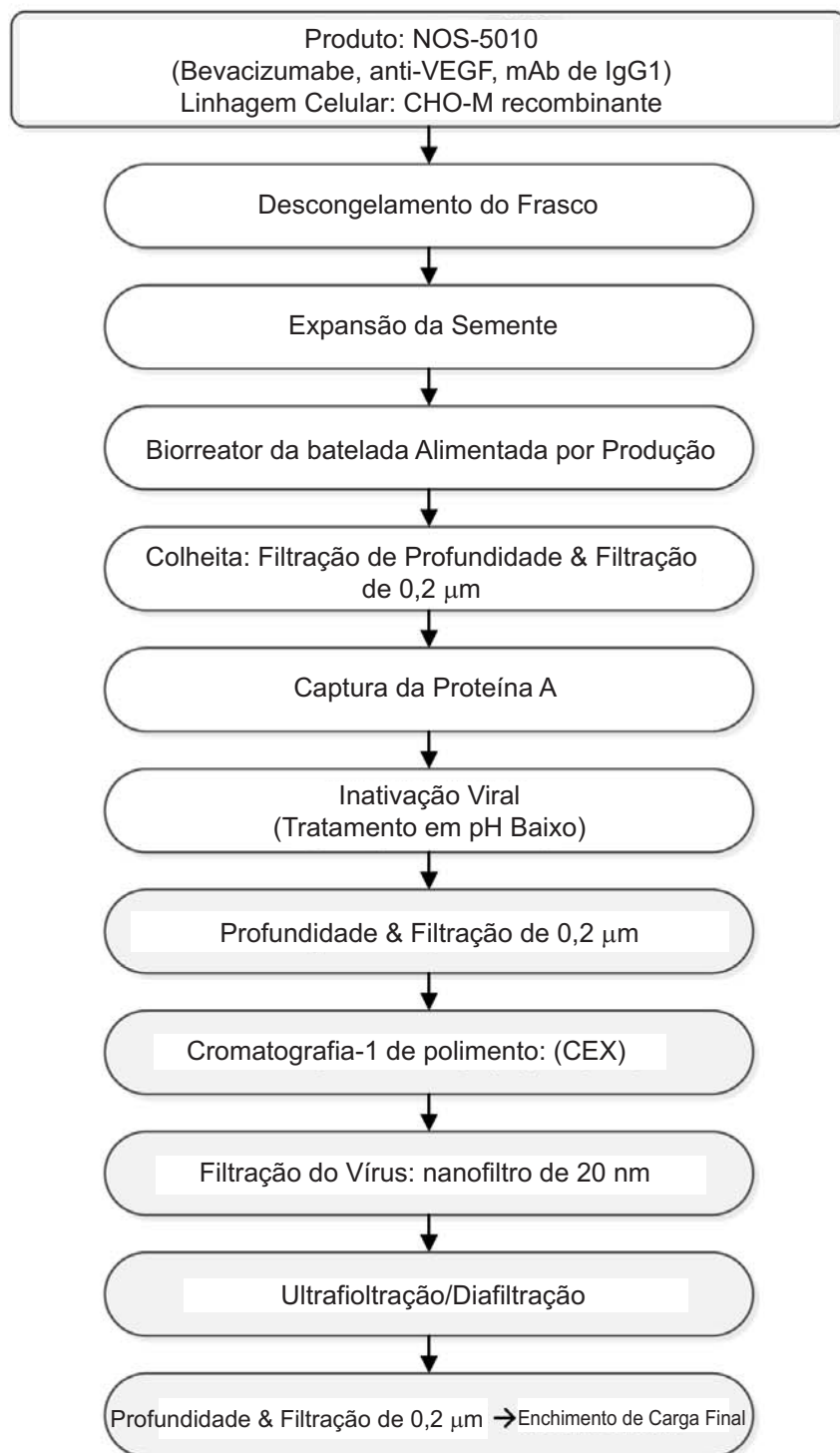
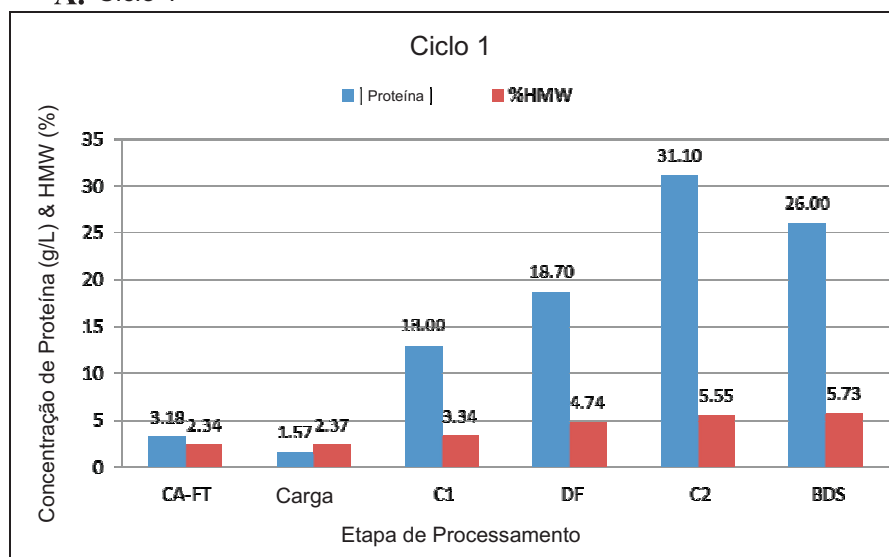


Fig. 6A

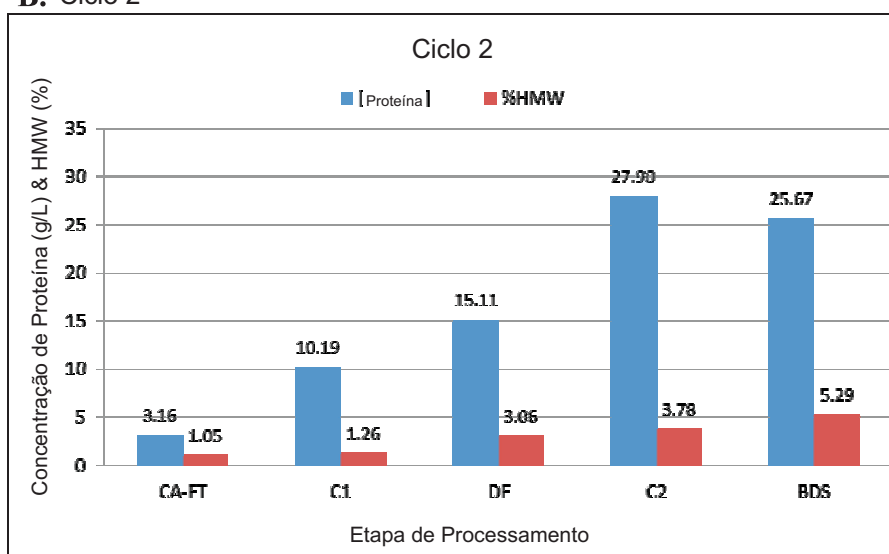
Concentração de Proteína e % de HMWS de Material Intermediário na UF/DF para uma Filtração de Fluxo Tangencial

A. Ciclo 1



Legenda: CA-FT – Carga; Carga – Carga Diluída; C1 – concentração pós-inicial; DF – pós-diafiltração; C2 – Concentração pós-final; BDS – filtração pós-final

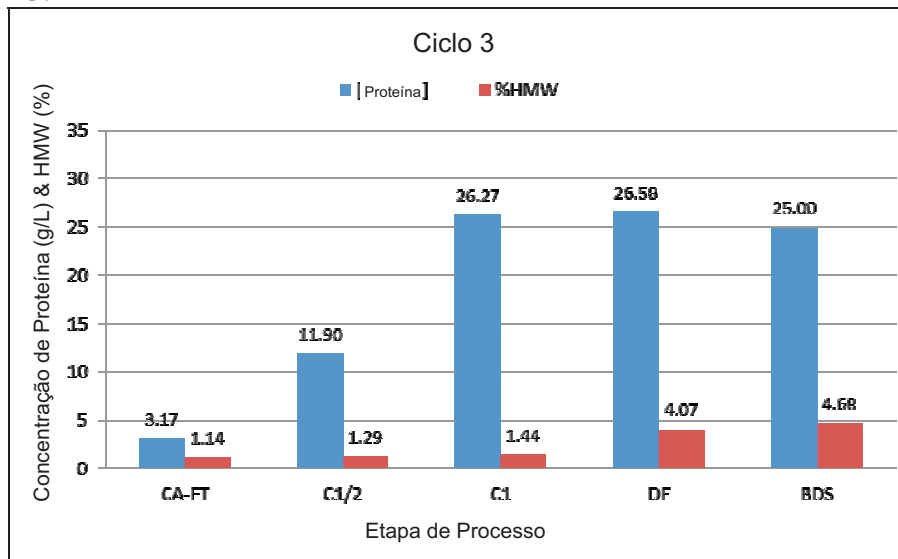
Fig. 6B

B. Ciclo 2

Legenda: CA-FT – Carga; C1 – concentração pós-inicial; DF – pós-diafiltração; C2 – Concentração pós-final; BDS – filtração pós-final

Fig. 6C

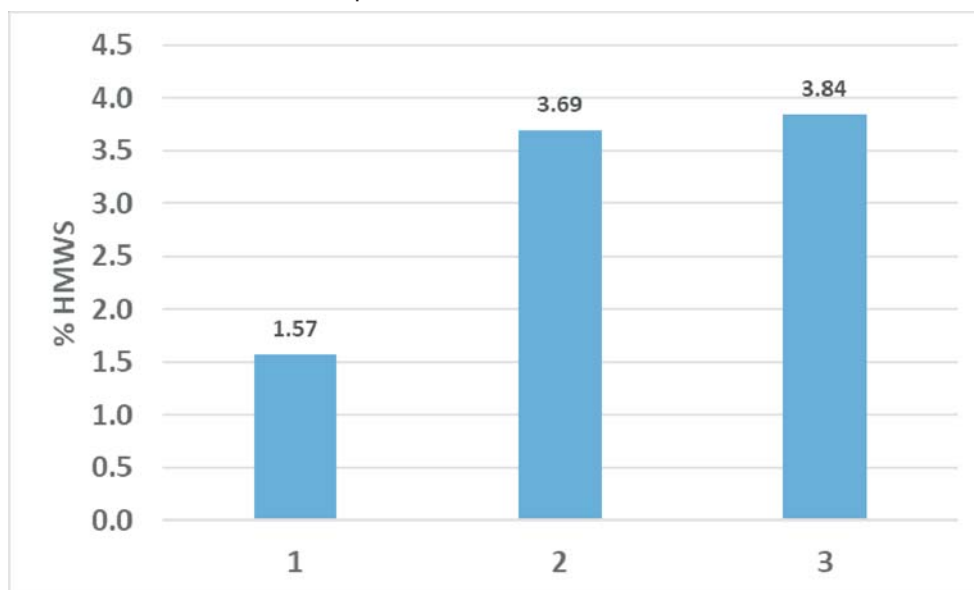
C. Ciclo 3



Legenda: CA-FT – Carga; C1 – pós-concentração para ½ do alvo;
C1 – pós-concentração; DF – pós-diafiltração; BDS – filtração pós-final

Fig. 7

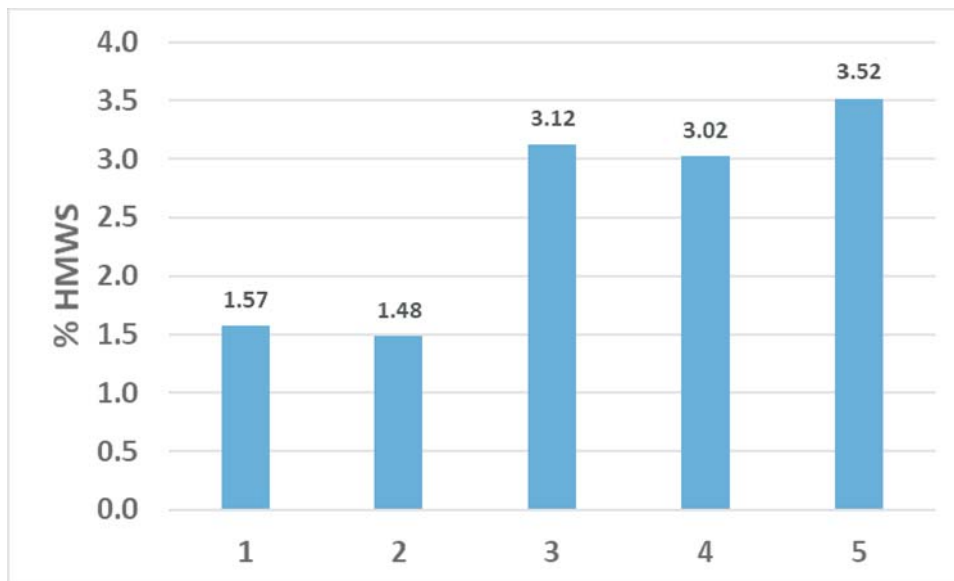
Resultados de SEC – HPLC para Material Titulado



Legenda: 1 – Material de Carga; 2 – Ajuste pós-pH; 3 – Pós-filtração

Fig. 8

Resultados de SEC-HPLC para Diafiltração em 6 % (w/v) de α,α' Trealose em Água
Seguido por Adição de Fosfato



Legenda: 1 – Material de Carga; 2 – pós-diafiltração; 3 – Pós-ajuste de pH via adição e fosfato e ajuste de concentração via adição de FFB; 4 – Pós-adição de OS-20; 5 – Pós-filtração de 0,2 μm (BDS)

Fig. 9

Impacto do pH sobre o % de HMWS em BDS

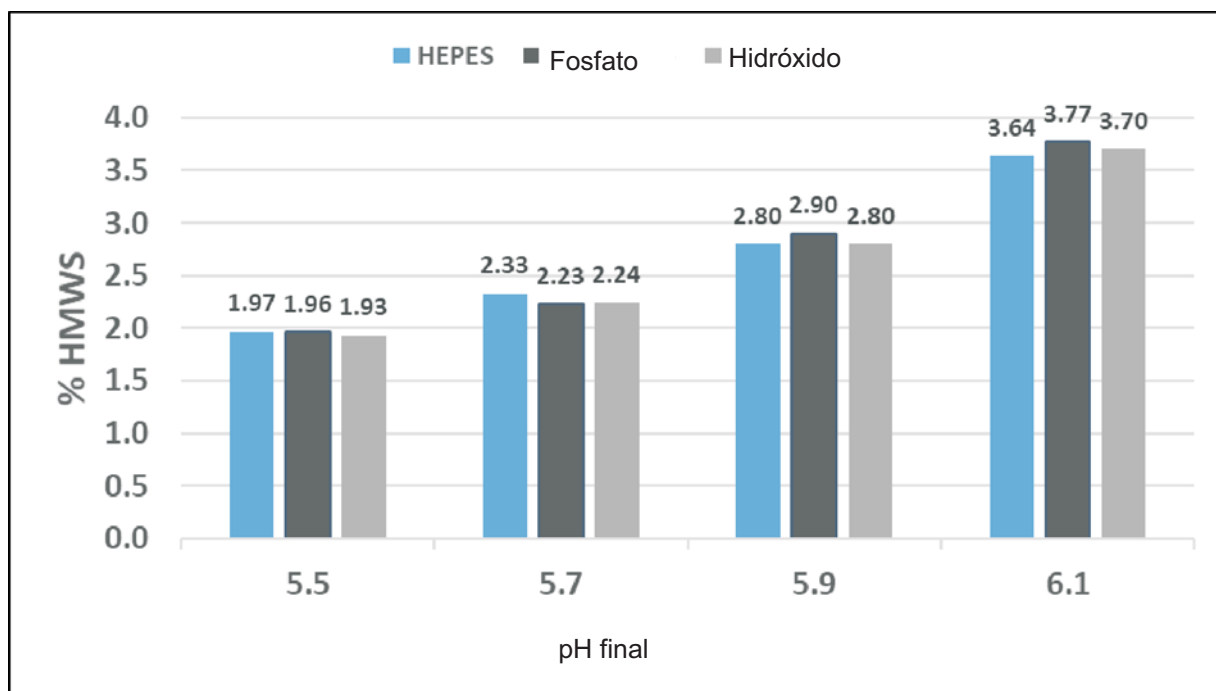
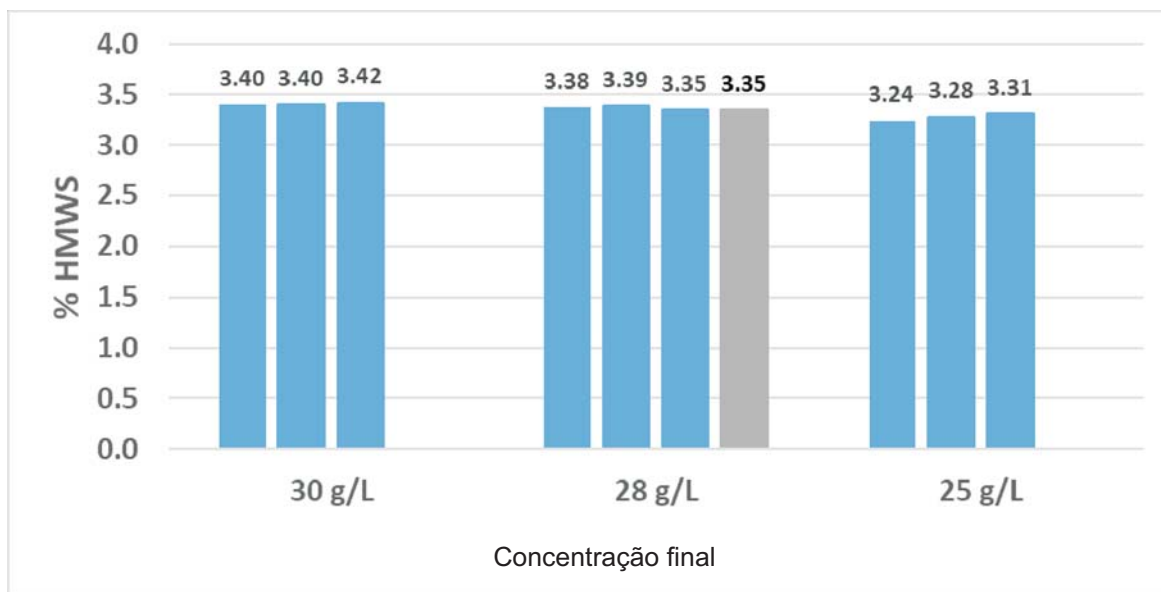


Fig. 10

Impacto da concentração no ajuste de pH sobre o % de HMWS¹



¹A barra cinza representa a alíquota na qual o ajuste de fosfato foi realizado com fosfato de sódio mono e dibásico sólido, ao invés de uma solução mãe.

Fig. 11

Diagrama de Fluxo do Processo para Operação de Unidade de UF/DF Final

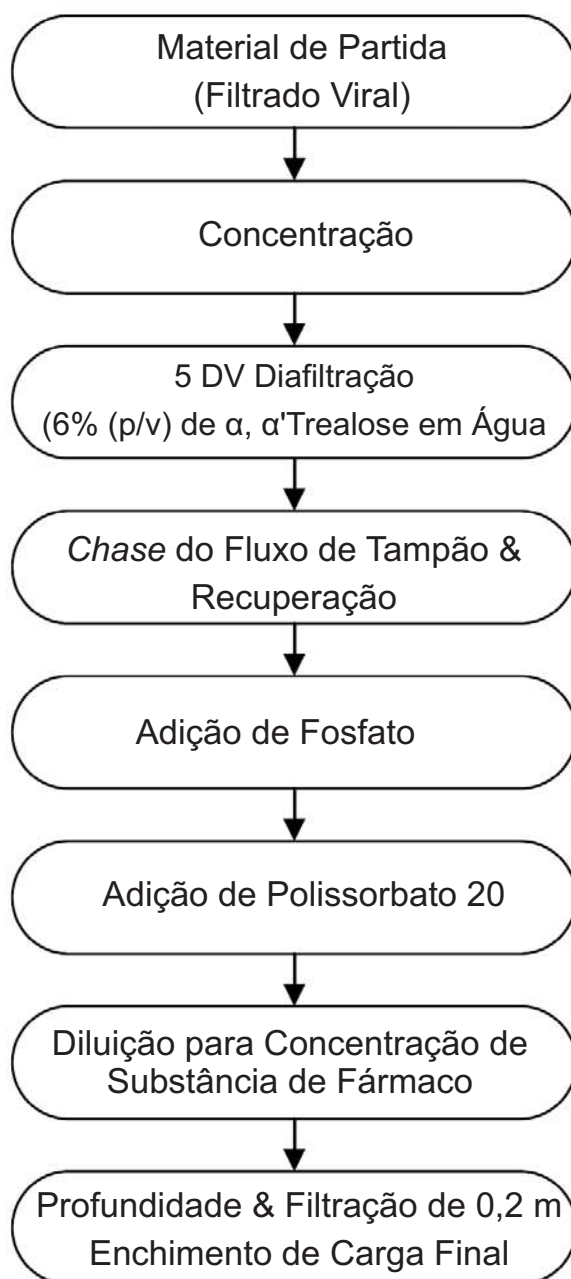


Fig. 12

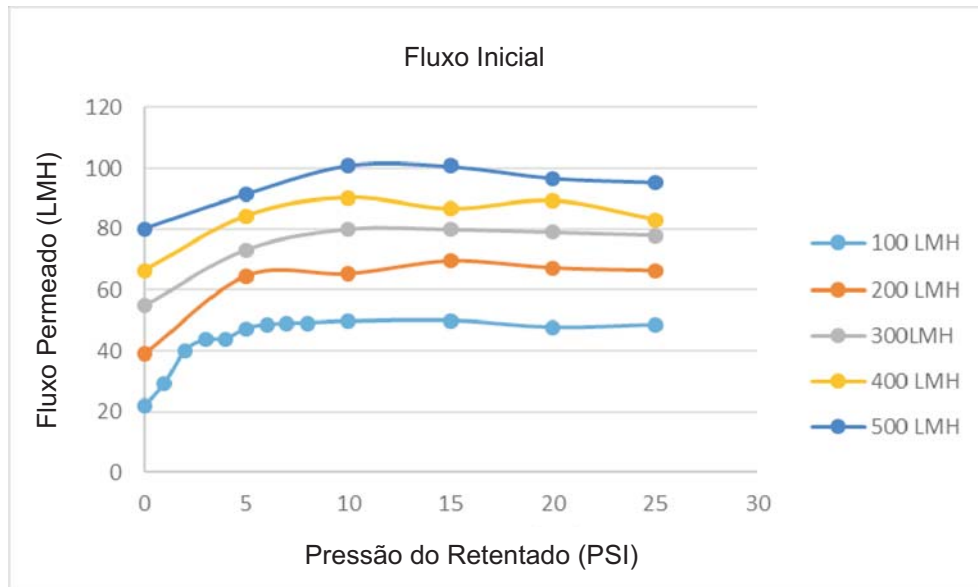


Fig. 13

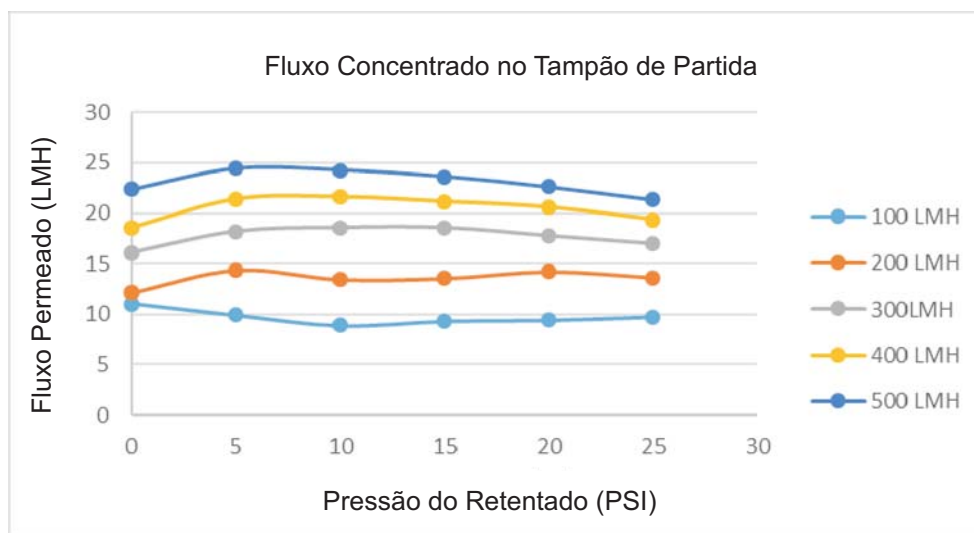


Fig. 14

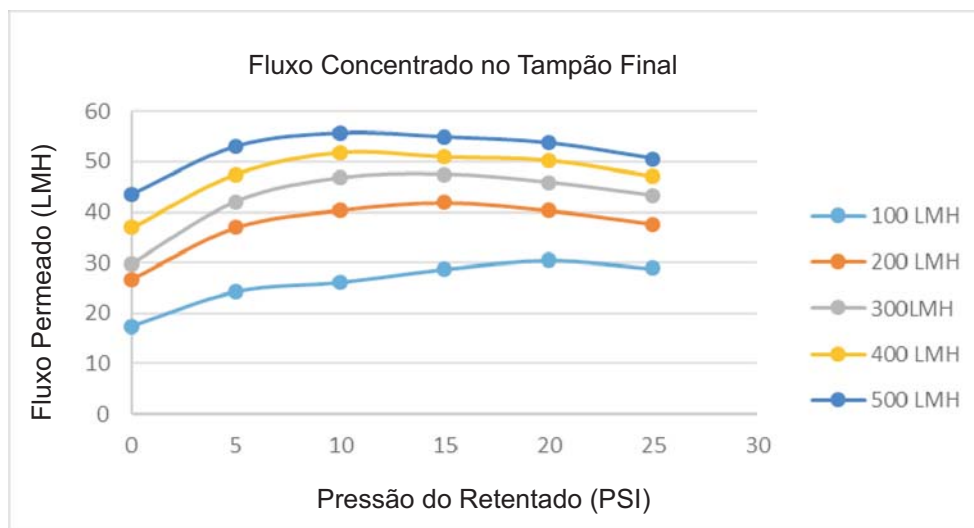


Fig. 15

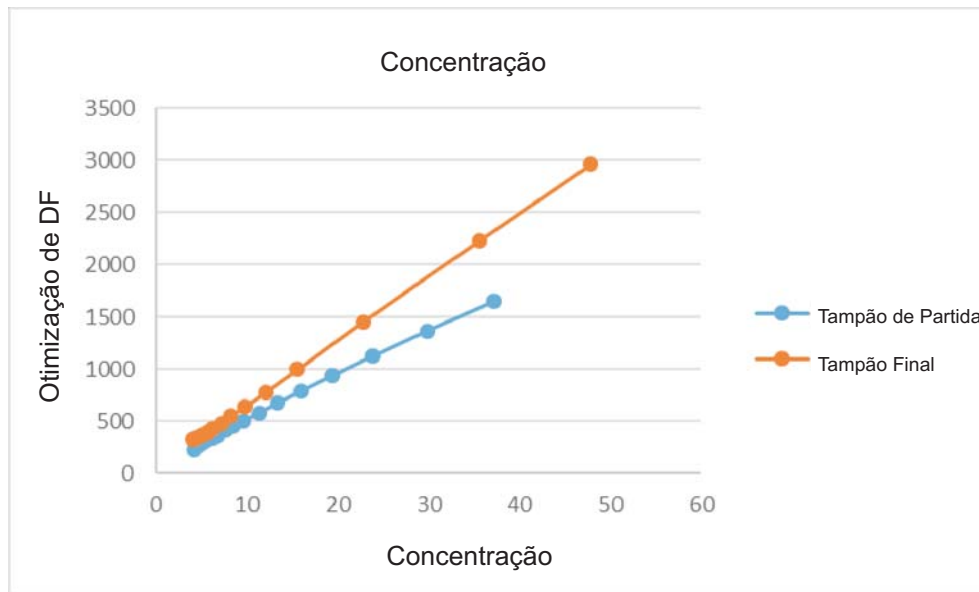
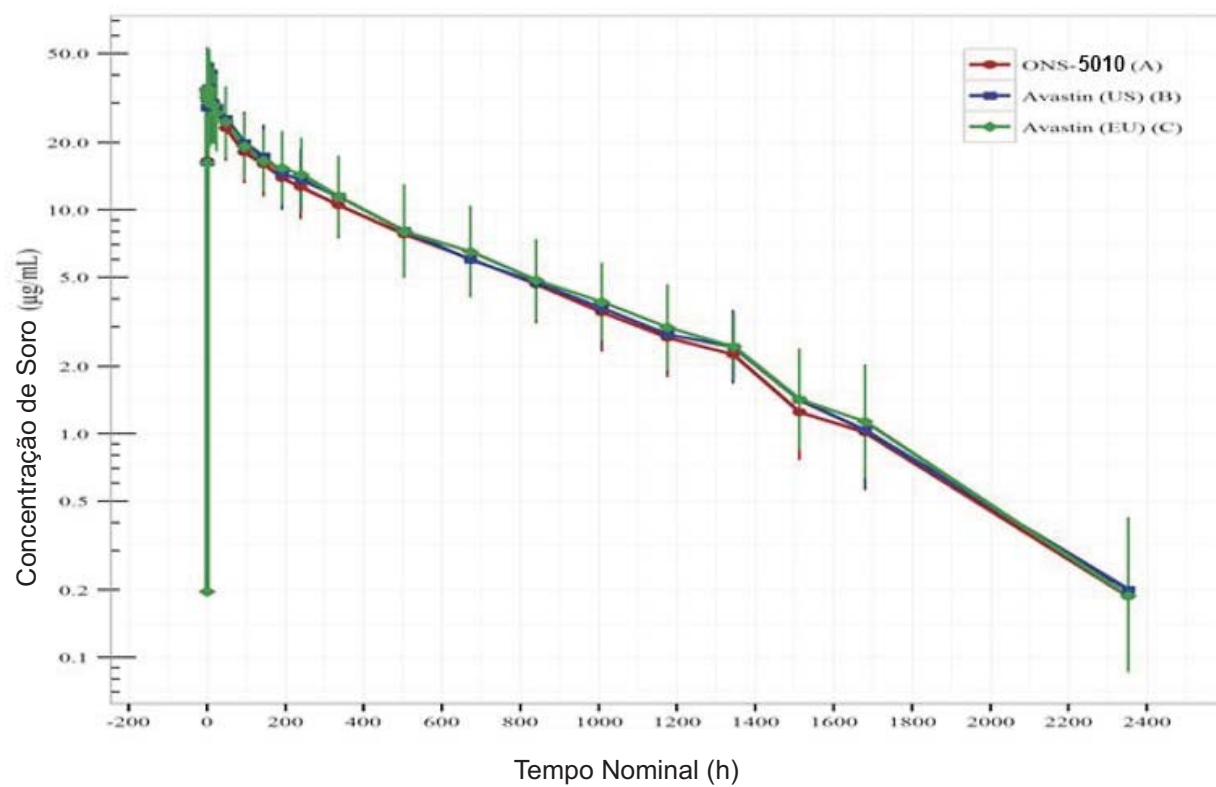


Fig. 16



RESUMO

Patente de Invenção: **"FORMULAÇÕES TAMPONADAS DE BEVACIZUMABE PARA USO NO TRATAMENTO DE DOENÇAS"**.

A invenção fornece formulações aquosas tamponadas de bevacizumabe. A invenção fornece ainda métodos de preparação de formulações tamponadas de bevacizumabe. A invenção fornece métodos de tratamento de distúrbios oculares, particularmente degeneração macular relacionada à idade úmida e edema macular pela administração das composições de anticorpo tamponadas da descrição.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA P249663.TXT
- Data de Geração do Código: 16/10/2020
- Hora de Geração do Código: 16:44:05
- Código de Controle:
 - Campo 1: 0D7D24970F78DDD2
 - Campo 2: 4E6F700D7440BEFD