



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0720125-7 A2



(22) Data de Depósito: 05/12/2007
(43) Data da Publicação: 28/01/2014
(RPI 2247)

(51) Int.Cl.:
A61K 9/19
A61K 39/395
A61K 47/26

(54) Título: MÉTODO PARA ARMAZENAR UMA FORMULAÇÃO LÍQUIDA; MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO LÍQUIDA; COMPOSIÇÃO; E MÉTODO PARA INIBIR A AGREGAÇÃO INDUZIDA POR MANITOL DE UMA PROTEÍNA EM UMA FORMULAÇÃO LÍQUIDA.

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 06/12/2006 US 60/873,526

(73) Titular(es): Wyeth

(72) Inventor(es): David Christopher Sek, Kin Ho

(74) Procurador(es): Trench, Rossi e Watanabe Advogados

(86) Pedido Internacional: PCT US2007086507 de 05/12/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/070721 de 12/06/2008

"MÉTODO PARA ARMAZENAR UMA FORMULAÇÃO LÍQUIDA; MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO LÍQUIDA; COMPOSIÇÃO; E MÉTODO PARA INIBIR A AGREGAÇÃO INDUZIDA POR MANITOL DE UMA PROTEÍNA EM UMA FORMULAÇÃO LÍQUIDA"

REFERÊNCIA A PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente Norte-americana Provisória nº 60/873.526, depositado em 6 de dezembro de 2006, que é aqui incorporado por referência em sua inteireza.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a métodos para armazenar e preparar formulações de proteína contendo manitol.

15

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

O manitol é geralmente usado em formulações de proteína para manter a estabilidade e a isotonicidade da formulação. No passado, usava-se nitrogênio líquido para congelar rapidamente formulações de proteína para armazenamento. Entretanto, quase todas as abordagens ao congelamento não controlado em grande escala de formulações líquidas padecem dos efeitos negativos da solidificação e derretimento não controlados. Demonstrou-se que um

controle inadequado da mudança de fase resulta em perdas de produto devido a agregação, precipitação, oxidação e desnaturação. Foram introduzidas tecnologias recentes para controlar o processo de congelamento e
5 descongelamento de formulações de proteína. Essas tecnologias tipicamente congelam e descongelam a uma taxa muito mais lenta. Como resultado, em formulações de proteína contendo manitol, o processo de congelamento-descongelamento lento permite a
10 cristalização do manitol que, por sua vez, induz a agregação da proteína. Para evitar a agregação da proteína induzida por manitol durante processos de congelamento-descongelamento lentos, os métodos existentes requerem a remoção do manitol das
15 formulações de proteína e sua adição de volta durante a operação pós-descongelamento.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção apresenta um método aperfeiçoado para armazenar e preparar formulações de
20 proteína contendo manitol. Especificamente, o método da presente invenção permite o armazenamento congelado de formulações de proteína contendo manitol sem remover primeiro o manitol. Consequentemente, a presente invenção reduz os custos e as etapas de processamento e

o tempo para armazenar e preparar formulações de proteína contendo manitol.

Em um aspecto, a presente invenção apresenta um método para armazenar uma formulação líquida, incluindo o resfriamento gradual da formulação líquida a uma temperatura menor que cerca de -10°C . A formulação líquida contém manitol e uma proteína, a proteína estando em uma concentração maior que 50 mg/mL, de modo que a maior concentração suprima a agregação de proteína durante o resfriamento.

Em uma modalidade, o método da presente invenção inclui o resfriamento gradual da formulação líquida a uma temperatura menor que cerca de -20°C . Em outra modalidade, o método da presente invenção inclui o resfriamento gradual da formulação líquida a uma temperatura de aproximadamente -40°C ou menos. Em ainda outra modalidade, o método da presente invenção inclui o resfriamento gradual da formulação líquida a uma temperatura de aproximadamente -50°C ou menos.

Em algumas modalidades, a presente invenção pode ser usada para armazenar as formulações líquidas contendo manitol em uma quantidade que varia de aproximadamente 0 a 15%. Em particular, a formulação líquida pode conter manitol em uma quantidade de

aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% ou 15%. As porcentagens estão em peso/peso, quando se referem a sólidos, e peso/volume, quando se referem a líquidos.

5 Em algumas modalidades, o método da presente invenção inclui o resfriamento gradual da formulação líquida a uma taxa de aproximadamente 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 ou 0,1°C/minuto.

10 Em algumas modalidades, a formulação líquida contém uma proteína em uma concentração maior que cerca de 75 mg/mL, 100 mg/mL, 125 mg/mL, 150 mg/mL ou 200 mg/mL. De preferência, a formulação líquida contém uma proteína em uma concentração entre 50 mg/mL e 200 mg/mL.

15 Em algumas modalidades, a formulação líquida contém uma proteína que é um anticorpo. Em particular, o anticorpo é um anticorpo monoclonal. Em outras modalidades, a formulação líquida contém uma proteína que é uma substância farmacêutica.

20 Em algumas modalidades, o método para armazenar uma formulação líquida da presente invenção é um intermediário do processo.

Em outro aspecto, a presente invenção apresenta um método para a preparação de uma formulação

líquida, incluindo o aquecimento gradual da formulação líquida de um estado congelado a uma temperatura maior que cerca de 0°C. A formulação líquida contém manitol e uma proteína em uma concentração maior que 50 mg/mL, de modo que a maior concentração suprima a agregação de proteína durante o aquecimento.

Em algumas modalidades, o método para a preparação de uma formulação líquida inclui o aquecimento gradual da formulação líquida de um estado congelado a uma temperatura de aproximadamente 10°C, 20°C, 25°C, 30°C ou maior.

Em algumas modalidades, a presente invenção pode ser usada para a preparação das formulações líquidas contendo manitol em uma quantidade que varia de aproximadamente 0 a 15%. Em particular, a formulação líquida contém manitol em uma quantidade de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% ou 15%. As porcentagens estão em peso/peso, quando se referem a sólidos, e peso/volume, quando se referem a líquidos.

Em algumas modalidades, o método para a preparação de uma formulação líquida inclui o aquecimento gradual da formulação líquida a uma taxa de

aproximadamente 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 ou 0,1°C/minuto.

Em algumas modalidades, a formulação líquida contém uma proteína em uma concentração maior que cerca
5 de 75 mg/mL, 100 mg/mL, 125 mg/mL, 150 mg/mL ou 200 mg/mL. De preferência, a formulação líquida contém uma proteína em uma concentração entre 50 mg/mL e 200 mg/mL.

Em algumas modalidades, a formulação líquida
10 contém uma proteína que é um anticorpo. Em particular, o anticorpo é um anticorpo monoclonal. Em outras modalidades, a formulação líquida contém uma proteína que é uma substância farmacêutica.

Em algumas modalidades, o método para a
15 preparação de uma formulação líquida da presente invenção é um intermediário do processo.

A formulação líquida da presente invenção é normalmente uma formulação aquosa.

A presente invenção também apresenta uma
20 composição contendo uma quantidade biologicamente eficaz da proteína na formulação líquida preparada pelo método da invenção conforme descrito em várias modalidades acima.

Em ainda outro aspecto, a presente invenção apresenta um método para inibir a agregação induzida por manitol de uma proteína em uma formulação líquida por aumento da concentração de proteína a uma
5 quantidade maior que 50 mg/mL. Em algumas modalidades, o método da presente invenção inibe a agregação induzida por manitol de uma proteína em uma formulação líquida por aumento da concentração de proteína a uma quantidade maior que cerca de 75 mg/mL, 100 mg/mL, 125
10 mg/mL, 150 mg/mL ou 200 mg/mL. Uma concentração típica de proteína é entre 50 mg/mL e 200 mg/mL.

Neste pedido, o uso de "ou" significa "e/ou", a menos que indicado de outra forma, Conforme usado neste pedido, o termo "compreende" e variações do
15 termo, como "compreendendo" e "compreendem", não se destinam a excluir outros aditivos, componentes, inteiros ou etapas. Conforme usados neste pedido, os termos "cerca de" e "aproximadamente" são usados como equivalentes. Quaisquer numerais usados neste pedido,
20 com ou sem cerca de/aproximadamente, destinam-se a cobrir quaisquer flutuações normais apreciadas por aqueles versados na técnica relevante.

Outras características, objetivos e vantagens da presente invenção ficam claros na descrição a

seguir. Deve-se entender, entretanto, que a descrição detalhada, embora indicando modalidades da presente invenção, é dada apenas a título de ilustração, não de limitação. Várias alterações e modificações dentro do
5 âmbito da invenção ficarão claras para aqueles versados na técnica com a descrição detalhada.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Os desenhos são apenas para fins de ilustração, não de limitação.

10 A Figura 1 ilustra uma amostra de traçado de temperatura do produto a cada escala exemplificativa do processo com um sistema CryoPilot (CP).

A Figura 2 mostra padrões de difração de raios X (XRD) de soluções de anticorpos congeladas,
15 quando resfriadas a -40°C , então, aquecidas a 20°C , ambos a $0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$.

A Figura 3 mostra uma amostra de termograma de calorimetria de varredura diferencial modulada (mDSC), quando se resfria um anticorpo monoclonal a uma
20 concentração de 30 mg/mL até -42°C .

A Figura 4 representa a entalpia total traçada contra a concentração de proteína durante um processo de congelamento e descongelamento lentos.

A Figura 5 representa cromatogramas de HPLC por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC-HPLC) de anticorpos representativos.

A Figura 6 representa a alteração na
5 porcentagem de espécies de alto peso molecular (HMW) traçada contra a concentração da proteína.

A Figura 7 expõe que o mesmo perfil de congelamento/descongelamento, com a mesma velocidade de
misturação, resultou em 2 conjuntos de traçados com
10 base nas cargas de produção.

A Figura 8 expõe que as taxas para congelamento e descongelamento mais rápidos do sistema
laboratorial eram mais rápidas que as taxas à carga de
produção mínima.

15 A Figura 9 expõe que as taxas para congelamento e descongelamento lentos do sistema
laboratorial eram mais lentas que as taxas à escala de
produção máxima.

A Figura 10 representa um fenômeno de super-
20 resfriamento típico observado durante o desenvolvimento
do ciclo em escala laboratorial para congelamento e
descongelamento lentos.

A Figura 11 expõe que o perfil revisado foi
realizado com 5 ensaios com tampão, seguidos por 5

ensaios com MabM, com ou sem manitol (15 no total) e que nenhum super-resfriamento foi observado em nenhum dos 10 traçados de termopares (0% de ocorrência).

A Figura 12 expõe que os traçados de temperatura de Mab e MabM se superpuseram e que não se observou nenhum super-resfriamento em nenhum dos 10 traçados de termopares até 5 operações com Mab, com ou sem manitol.

A Figura 13 ilustra que a porcentagem de espécies HMW aumentou mais significativamente após múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento a taxas lentas, em comparação com taxas rápidas.

A Figura 14 ilustra que nenhum aumento nas espécies HMW é observado com formulação de Mab a uma concentração de 100 mg/mL contendo manitol.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção apresenta um método aperfeiçoado para armazenar e preparar formulações de proteína contendo manitol. Especificamente, a presente invenção apresenta um método para suprimir ou eliminar a agregação de proteína induzida por manitol em uma formulação líquida durante um processo de congelamento e/ou descongelamento lento por aumento da concentração de proteína.

Vários aspectos da invenção são descritos em maiores detalhes nas subseções a seguir. O uso de subseções não se detina a limitar a invenção. Cada subseção pode se aplicar a qualquer aspecto da
5 invenção.

Formulações de proteína contendo manitol

Proteínas são relativamente instáveis no estado aquoso e sofrem degradação química e física, resultando em uma perda de atividade biológica durante
10 o processamento e armazenamento. Congelamento-descongelamento e liofilização são métodos bem estabelecidos para preservar proteínas para armazenamento. Para preservar a conformação, atividade e estabilidade da proteína, as formulações de proteína
15 normalmente contêm agentes que facilitam isso, os chamados lioprotetores e crioprotetores. Crioprotetores são agentes que conferem estabilidade a uma proteína contra os estresses induzidos por congelamento; entretanto, o termo também inclui agentes que confirmam
20 estabilidade, por exemplo, a formulações a granel de fármacos durante o armazenamento contra estresses não induzidos por congelamento. Lioprotetores são agentes que conferem estabilidade a uma proteína durante a remoção da água do sistema durante o processo de

secagem, presumivelmente por manutenção da conformação apropriada da proteína mediante pontes de hidrogênio. Crioprotetores também podem ter efeitos lioprotetores. Exemplos de agentes de volume frequentemente usados
5 incluem manitol, glicina, sacarose, lactose e outros. Os agentes também contribuem para a tonicidade das formulações.

Conforme aqui usado, "proteínas" incluem qualquer polipeptídio recombinante ou purificado,
10 incluindo, mas não limitados a, anticorpos, por exemplo, anticorpos monoclonais, anticorpos de cadeia única e outras variantes de anticorpos; vários hormônios de crescimento; e quaisquer substâncias farmacêuticas. As proteínas mencionadas neste pedido
15 incluem qualquer polipeptídio de ocorrência natural, modificado ou sintetizado.

Conforme aqui usado, "uma formulação de proteína", "uma formulação líquida" ou equivalentes gramaticais incluem qualquer composição líquida
20 contendo polipeptídio. Tipicamente, uma formulação líquida da invenção é uma formulação aquosa. As composições líquidas contendo polipeptídio também podem conter um "agente de tampão", incluindo aqueles agentes que mantêm o pH da solução em uma faixa aceitável e

podem incluir os agentes de volume acima descritos e também podem incluir histidina, fosfato, citrato, tris, dietanolamina e outros. Se as composições líquidas contendo polipeptídeo forem composições farmacêuticas, a formulação líquida também pode conter "excipientes". O termo "excipientes" inclui veículos farmacêuticos aceitáveis, assim como lioprotetores e crioprotetores que proporcionem uma conformação apropriada da proteína durante o armazenamento, de modo que seja mantida uma retenção substancial da atividade biológica e da estabilidade da proteína.

Manitol induz agregação da proteína durante o congelamento e descongelamento lentos

Conforme acima discutido, congelamento e descongelamento é um método bem estabelecido para armazenamento a longo prazo ou como uma etapa intermediária. Entretanto, quase todas as abordagens de congelamento em grande escala de formulações líquidas padecem dos efeitos negativos da solidificação e derretimento não controlados. Abordagens como o congelamento em bolsas e garrafas mostraram repetidamente que resultam em crioconcentração e perfis de temperatura não uniformes dentro dos recipientes. Demonstrou-se que um controle inadequado da mudança de

fase resulta em perdas de produto devido a agregação, precipitação, oxidação e desnaturação. Em contraste, um congelamento e descongelamento controlados (também chamados de congelamento e descongelamento lentos) evita a desnaturação de produto típica de métodos não controlados e elimina uma limpeza cara e demorada. Além disso, os processos globais se beneficiam de uma operação bem controlada e previsível.

Um congelamento controlado (ou congelamento lento) tipicamente inclui o resfriamento gradual de uma formulação líquida a uma temperatura adequada para armazenamento a uma taxa predeterminada. Tipicamente, uma temperatura adequada para armazenamento inclui, mas não se limita a, uma temperatura de ou menor que cerca de -10°C , -20°C , -30°C , -40°C , -50°C . O resfriamento gradual por etapas pode ser a uma taxa de aproximadamente 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 ou $0,1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$.

Da mesma forma, um descongelamento controlado (descongelamento lento) tipicamente inclui o aquecimento gradual de uma formulação líquida de um estado congelado até uma temperatura desejada a uma taxa predeterminada. Tipicamente, a temperatura desejada para descongelamento inclui, mas não se limita

a, uma temperatura de ou maior que cerca de 0°C, 10°C, 20°C ou 30°C. O aquecimento gradual por etapas pode ser a uma taxa de aproximadamente 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 ou 0,1°C/minuto.

5 O congelamento e descongelamento controlados podem ser realizados em um recipiente, como um tubo, uma bolsa, uma garrafa ou quaisquer outros recipientes adequados. Os recipientes podem ser descartáveis. O congelamento e descongelamento controlados podem ser
10 realizados em grande escala ou pequena escala. Para uma produção em grande escala típica, uma formulação líquida pode ser congelada em lotes de cerca de 1 L a 300 L, por exemplo, 3L. Para um sistema em pequena escala típico, uma formulação líquida pode ser
15 congelada em lotes de cerca de 1 mL a 500 mL, por exemplo, 30 mL.

Entretanto, em formulações líquidas contendo manitol, o congelamento e/ou descongelamento lento permite a cristalização do manitol que, por sua vez,
20 induz a agregação de proteína. Conforme aqui usado, "agregação de proteína" significa a formação de espécies de alto peso molecular (HMW), incluindo tanto espécies insolúveis detectáveis por medição da turvação, quanto espécies solúveis detectáveis por HPLC

por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC-HPLC), HPLC de troca de cátions (CEX-HPLC), difração de raios X (XRD), calorimetria de varredura diferencial modulada (mDSC) e outros meios conhecidos por aqueles versados na técnica.

Observa-se que há um aumento substancial na porcentagem de espécies HMW em formulações contendo manitol com ciclos múltiplos de congelamento e descongelamento (veja a seção de Exemplos). Uma quantidade aumentada de manitol na formulação também resulta em uma maior porcentagem de formação de espécies HMW. Um volume de processamento reduzido parece manter a porcentagem de espécies HMW formadas em comparação com a grande escala (por exemplo, 125 L).

Observa-se um evento exotérmico durante o resfriamento de formulações contendo manitol. A entalpia observada, que é devida à cristalização do manitol, assim como à água não congelada, aumenta quando aumenta a escala de processamento (as taxas de congelamento e descongelamento diminuem), ou o nível de manitol na formulação aumenta. Também se observa um evento de cristalização com o descongelamento da formulação contendo manitol. Sem nos limitarmos a uma teoria, os eventos de cristalização na solução

congelada sugerem que a transição de fase devida à cristalização pode induzir a agregação de proteína com o congelamento e descongelamento. A cristalização do manitol aumenta com o nível do manitol, o que
5 corresponde a uma maior % de formação de HMW. Havia mais cristalização de manitol observada na simulação de processo em escala maior do que na escala menor, mais uma vez correlacionada a uma maior taxa de formação de HMW. A diminuição do manitol na formulação em geral
10 favorece a redução da formação de espécies HMW na formulação líquida durante o congelamento e descongelamento.

Concentração aumentada de proteína suprime a agregação de proteína

15 A presente invenção descobriu que o aumento da concentração de proteína na formulação líquida suprime ou inibe a agregação de proteína durante o processo de congelamento e/ou descongelamento lento. Conforme descrito na seção de Exemplos, descobriu-se
20 que o aumento da concentração de proteína acima de 20-30 mg/mL resultava em uma diminuição na quantidade de formação de espécies HMW. Sem nos limitarmos a uma teoria, considera-se que a agregação de proteína aumentada a baixa concentração de proteína (por

exemplo, < 20 mg/mL) pode ser causada pela maior probabilidade de duas moléculas se encontrarem durante o congelamento e/ou descongelamento. Tipicamente, usa-se uma concentração de proteína maior que 50 mg/mL para suprimir a agregação de proteína. De preferência, usa-se uma concentração de proteína maior que cerca de 75 mg/mL, 100 mg/mL, 125 mg/mL ou 150 mg/mL para suprimir a agregação de proteína. Mais preferivelmente, usa-se uma concentração de proteína entre 50 mg/mL e 200 mg/mL. Conforme aqui usado, o termo "suprime a agregação de proteína" ou equivalentes gramaticais designa uma redução da porcentagem de espécies HMW em uma formulação líquida, em comparação com a porcentagem de espécies HMW formadas em uma formulação líquida similar, mas contendo uma concentração de proteína menor que 20 mg/mL. O termo "suprime a agregação de proteína" também inclui a inibição ou eliminação da formação de espécies HMW.

Assim, com o aumento da concentração de proteína na formulação líquida contendo manitol, a presente invenção permite um congelamento e/ou descongelamento lento da formulação líquida, sem induzir uma agregação de proteína significativa. A presente invenção é particularmente útil para armazenar

um produto farmacológico contendo uma substância farmacológica. Por exemplo, a presente invenção permite que todos os excipientes, incluindo manitol, em um produto farmacológico estejam presentes durante o
5 processo de processo de congelamento e/ou descongelamento lento, mantendo, ao mesmo tempo, a substância farmacológica estável e biologicamente ativa. Consequentemente, a presente invenção elimina a necessidade de remover o manitol da formulação
10 farmacológica antes do armazenamento e sua adição de volta durante a operação de enchimento do produto farmacológico.

Assim, as formulações líquidas contendo manitol e uma concentração de proteína maior que 50
15 mg/mL podem ser armazenadas diretamente nessa forma para uso posterior, armazenadas em um estado congelado como uma etapa intermediária e descongeladas antes do uso, ou subsequentemente preparadas em forma seca, como uma forma liofilizada, secada ao ar ou secada por
20 pulverização, para posterior reconstituição em uma forma líquida ou outra forma antes do uso. Além disso, composições contendo uma quantidade biologicamente ativa da proteína podem ser preparadas e armazenadas diretamente em sua forma líquida, de acordo com o

presente pedido, para se aproveitarem plenamente da conveniência, facilidade de administração sem reconstituição e capacidade de suprir a formulação em seringas pré-enchidas, prontas para o uso, ou como
5 preparações de múltiplas doses, se a formulação for compatível com agentes bacteriostáticos. O presente pedido também apresenta outras formas de composições contendo uma quantidade biologicamente ativa da proteína na formulação líquida armazenada e preparada
10 conforme acima descrito.

Deve-se entender que as modalidades acima descritas e os exemplos a seguir são dados a título de ilustração, não de limitação. A formulação líquida da presente invenção é aplicável a proteínas em geral. Por
15 exemplo, os anticorpos usados nas formulações líquidas descritas na seção de Exemplos podem ser qualquer anticorpo. Várias alterações e modificações dentro do âmbito da presente invenção serão evidentes para aqueles versados na técnica com a presente descrição.

20

EXEMPLOS

Exemplo 1. Congelamento e descongelamento lentos de uma formulação de anticorpo monoclonal

Uma formulação contendo um anticorpo monoclonal (Mab) a várias concentrações e 10 mM de

histidina, 10 mM de metionina, 0-4% de manitol e 0-0,02% de polissorbato-80 foi congelada e descongelada múltiplas vezes usando-se um sistema CryoPilot (CP) (Stedim Biosystems). Cada perfil de congelamento e descongelamento incluiu um resfriamento por etapas a -55°C e um aquecimento a 32°C, enquanto se misturava a solução.

O CP simula a operação de um CryoVessel (Stedim Biosystems), a unidade de produção em escala total. Os perfis de ajuste do CP para vários volumes de processo haviam sido desenvolvidos antes deste trabalho, para imitar o comportamento do CryoVessel. A Figura 1 ilustra uma amostra de traçado de temperatura do produto a cada escala de processo com o sistema CP. A taxa de congelamento (ou descongelamento) foi definida como o termopar que atinge -42°C a partir de 0°C (ou 0°C a partir de -42°C) dividido pelo tempo.

As amostras descongeladas foram analisadas principalmente por SEC-HPLC e CEX-HPLC para avaliar o nível de espécies de alto peso molecular (%HMW) e rastrear os níveis de espécies ácidas e básicas. Também se usou calorimetria de varredura diferencial modulada (mDSC) e difração de raios X (XRD) para avaliar a

cristalinidade e os polimorfos de manitol em soluções congeladas.

Exemplo 2. Manitol induz a agregação de proteína durante o congelamento e descongelamento lentos

Verificou-se que um anticorpo monoclonal humanizado (chamado de MAB-001 neste experimento) agrega-se na presença de manitol durante um processo de congelamento-descongelamento lentos similar ao descrito no Exemplo 1. A Figura 2 mostra os padrões XRD de soluções congeladas de MAB-001 quando resfriadas a -40°C, então, aquecidas a 20°C, ambos a 0,5°C/minuto. A solução congelada foi varrida a -42°C, -30°C e -10°C. Conforme mostrado na Figura 2, a quantidade de cristalização aumentou com a quantidade de manitol na formulação, a uma maior concentração de proteína suprimiu a cristalização do manitol.

Além de XRD, também se usou calorimetria de varredura diferencial modulada (mDSC) para examinar a cristalização do manitol nas amostras de MAB-001. A Figura 3 mostra uma amostra de termograma de mDSC quando se resfria MAB-001 a uma concentração de 30 mg/mL até -42°C. A entalpia observada (traçado marrom na Figura 3) é devida à cristalização do manitol

conforme mostrado na Figura 2. Se se considerar a entalpia total como igual à entalpia de resfriamento mais a entalpia de aquecimento, então, a entalpia total pode ser traçada contra a concentração de proteína conforme mostrado na Figura 4. Conforme também mostrado na Figura 4, uma concentração aumentada de proteína (por exemplo, > 30 mg/mL) suprimiu a cristalização do manitol.

Exemplo 3. Uma maior concentração de proteína
10 suprime a cristalização de manitol

Três anticorpos, chamados de MAB-001, MAB-002 e MAB-003, foram dialisados em 10 mM de histidina, 250 mM de manitol, pH 6,0, então, submetidos a cinco ciclos de congelamento-descongelamento e monitorizados quanto à formação de espécies HMW. Os cromatogramas SEC-HPLC
15 são mostrados na Figura 5. Conforme mostrado na Figura 5, para cada uma das três proteínas MAB-001, MAB-002 e MAB-003, uma concentração aumentada da proteína na formulação suprimiu a formação de espécies HMW. A
20 alteração da porcentagem de espécies HMW foi traçada contra a concentração da proteína na Figura 6. Conforme mostrado na Figura 6, para cada uma das três proteínas, o aumento da concentração da proteína acima de 20-30 mg/mL diminuiu a quantidade de formação de HMW

detectada por SEC-HPLC. Esse resultado era consistente com os dados de mDSC.

Exemplo 4. Escala laboratorial versus escala de produção

5 Os ciclos de congelamento/descongelamento rápidos e lentos foram desenvolvidos em um sistema laboratorial S³ Celsius (Stedim Biosystems) para corresponderem ao traçado de produto da escala de produção e para delimitar as cargas de produção mínima
10 e máxima. Usou-se o FT-100 Celsius (Stedim Biosystems) a diferentes cargas de produção. Para uma carga de produção mínima, usaram-se 4,2 L (1 bolsa). Para uma carga de produção máxima, usaram-se 100 L (6 bolsas a 16,6 L cada). O mesmo perfil de ajustes de
15 congelamento/descongelamento com a mesma velocidade de misturação do FT-100 resultou em 2 conjuntos de traçados de temperatura de produto com base nas cargas de produção, conforme mostrado na Figura 7.

O desenvolvimento do ciclo de congelamento e
20 descongelamento foi realizado usando-se o sistema em escala laboratorial S³. Conforme mostrado na Figura 8, as taxas para congelamento e descongelamento mais rápidos do sistema laboratorial foram mais rápidas do que as taxas à carga de produção mínima. Conforme

mostrado na Figura 9, as taxas para congelamento e descongelamento lentos do sistema laboratorial foram mais lentas do que as taxas à escala de produção máxima.

5 Observou-se um super-resfriamento durante o desenvolvimento do ciclo de escala laboratorial para o congelamento e descongelamento lentos. Um fenômeno de super-resfriamento típico é mostrado na Figura 10. A temperatura de congelamento é deprimida quando ocorre o
10 super-resfriamento. O fenômeno de super-resfriamento foi observado em 2 de 3 ensaios de ciclos de congelamento/descongelamento lentos (67% de ocorrência). O super-resfriamento poderia ser uma ocorrência aleatória em operações com proteína e tampão
15 ou pode ser causado por posições da bolsa, que eram imprevisíveis. O super-resfriamento afetou o cálculo do tempo de congelamento normal (NFT) (de 5°C para -5°C). O super-resfriamento pode estar relacionado ao nível de concentração de proteína.

20 Para evitar o super-resfriamento, usou-se um anticorpo monoclonal como uma proteína modelo (MabM) para desenvolver o ciclo de congelamento e descongelamento lentos do sistema laboratorial. O MabM foi concentrado e dialisado na solução tampão de

formulação de Mab, então, diluído nas seguintes concentrações: 50 mg/mL, 100 mg/mL e 150 mg/mL. Prepararam-se as formulações sem manitol, seguido por congelamento e descongelamento 5 vezes usando-se o sistema laboratorial. Adicionou-se, então, manitol sólido às formulações livres de manitol. Essas soluções foram novamente congeladas e descongeladas 5 vezes com o sistema laboratorial. O perfil de congelamento/descongelamento lentos foi revisado por extensão do tempo de congelamento profundo inicial e redução da temperatura de congelamento inicial para facilitar a nucleação. Conforme mostrado na Figura 11, o perfil revisado foi realizado em 5 ensaios com tampão, seguidos por 5 ensaios com MabM com ou sem manitol (15 no total), e nenhum super-resfriamento foi observado em nenhum dos 10 traçados de termopar (0% de ocorrência). Uma mistura manual após o descongelamento foi requerida para todos os níveis de concentração de proteína.

Os perfis de congelamento e descongelamento rápidos e lentos acima desenvolvidos foram usados para avaliar a possibilidade de congelar e descongelar uma substância farmacológica de anticorpo monoclonal (Mab). Usou-se o S³ Celsius de escala laboratorial neste

experimento. As avaliações do ensaio incluíram observação visual de crioconcentração, SEC HPLC para HMW e espécies de baixo peso molecular (LMW), pH, turvação por A400, concentração e CEX HPLC. Conforme
5 mostrado na Figura 12, os traçados de temperatura de produto de Mab e MabM se superpuseram. Não se observou nenhum super-resfriamento para nenhum dos 10 traçados de termopar até 5 operações com Mab com ou sem manitol. Uma mistura manual após o descongelamento foi
10 requerida para todos os níveis de concentração.

Exemplo 5. A formação de HMW se relacionada às taxas de congelamento e descongelamento

Conforme mostrado na Figura 13, a porcentagem de espécies HMW aumentou mais significativamente após
15 múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento a taxas lentas, em comparação com taxas rápidas. Não se observou nenhuma alteração na quantidade de espécies LMW, pH, turvação, concentração, assim como de espécies ácidas e básicas. Também conforme mostrado na Figura
20 13, o aumento de espécies HMW só foi observado em uma formulação com uma concentração de proteína de 50 mg/mL e contendo manitol. Conforme mostrado na Figura 14, não se observou nenhum aumento de espécies HMW com a formulação de Mab a uma concentração de 100 mg/mL

contendo manitol. Além disso, observou-se que Mab sem manitol permanecia estável durante até 5 ciclos de congelamento e descongelamento em bolsas Stedim com concentrações de 50 e 150 mg/mL.

5

INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

Todas as publicações e documentos de patentes citados neste pedido são incorporados por referência em sua inteireza para todas as finalidades, na mesma medida que se o conteúdo de cada publicação ou
10 documento de patente individual fosse aqui incorporado.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para armazenar uma formulação líquida, o método **caracterizado** pelo fato de que compreende o resfriamento gradual da formulação líquida a uma temperatura menor do que -10°C , em que a formulação líquida compreende manitol e uma proteína, a proteína estando em uma concentração maior que 50 mg/mL, de modo que a maior concentração suprima a agregação de proteína durante o resfriamento.

10 2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a temperatura é de aproximadamente -20°C , -40°C ou -50°C .

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o manitol está em uma quantidade de aproximadamente 0-15%.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o resfriamento é a uma taxa de aproximadamente $0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, $0,3^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ ou $0,1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$.

20 5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a proteína está em uma concentração entre 50 mg/mL e 200 mg/mL.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a proteína está em uma

concentração maior que 75 mg/mL, 100 mg/mL, 125 mg/mL ou 150 mg/mL.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a proteína é um anticorpo.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a proteína é uma substância farmacêutica.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o método é um intermediário do processo.

11. Método para a preparação de uma formulação líquida, o método **caracterizado** pelo fato de que compreende o aquecimento gradual da formulação líquida de um estado congelado a uma temperatura maior que 0°C, em que a formulação líquida compreende manitol e uma proteína, a proteína estando em uma concentração maior que 50 mg/mL, de modo que a maior concentração suprima a agregação de proteína durante o aquecimento.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que a temperatura é de aproximadamente 20°C ou 30°C.

13. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que o manitol está em uma quantidade de aproximadamente 0-15%.

14. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que o aquecimento é a uma taxa de aproximadamente 0,5°C/minuto, 0,3°C/minuto ou 0,1°C/minuto.

15. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que a proteína está em uma concentração entre 50 mg/mL e 200 mg/mL.

16. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que a proteína está em uma concentração maior que 75 mg/mL, 100 mg/mL, 125 mg/mL ou 150 mg/mL.

17. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que a proteína é um anticorpo.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

19. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que a proteína é uma substância farmacêutica.

20. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que o método é um intermediário do processo.

21. Composição, **caracterizada** pelo fato de que compreende uma quantidade biologicamente eficaz de proteína na formulação líquida preparada pelo método de acordo com a reivindicação 11.

22. Método para inibir a agregação induzida por manitol de uma proteína em uma formulação líquida, **caracterizado** pelo fato de que o método compreende o aumento da concentração da proteína a uma quantidade maior que 50 mg/mL.

23. Método, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizado** pelo fato de que a proteína está em uma concentração maior que 75 mg/mL, 100 mg/mL, 125 mg/mL ou 150 mg/mL.

Congelamento e descongelamento em CryoPilot

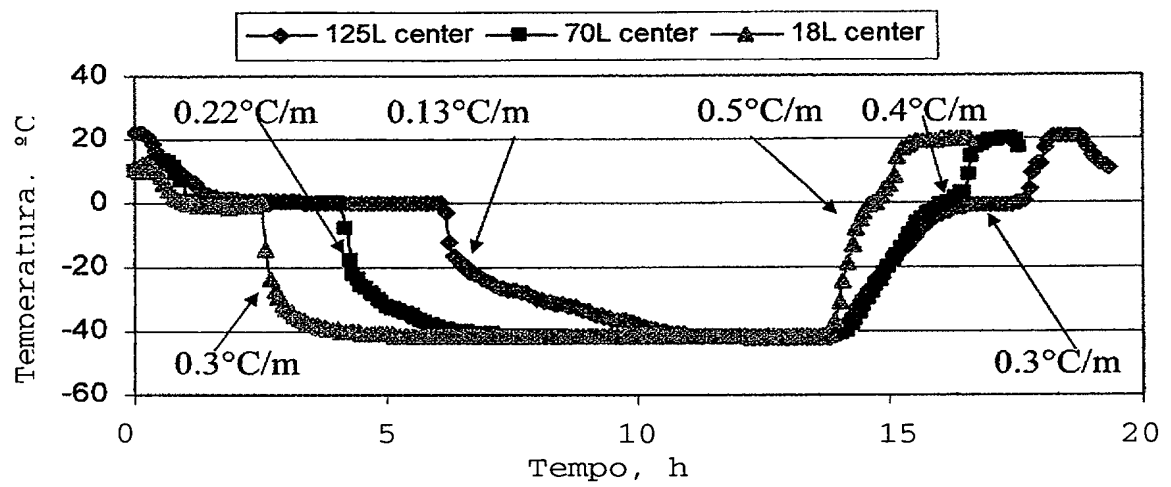


Figura 1

MAB-001 DS (congelamento e descongelamento a 0,5°C/min)

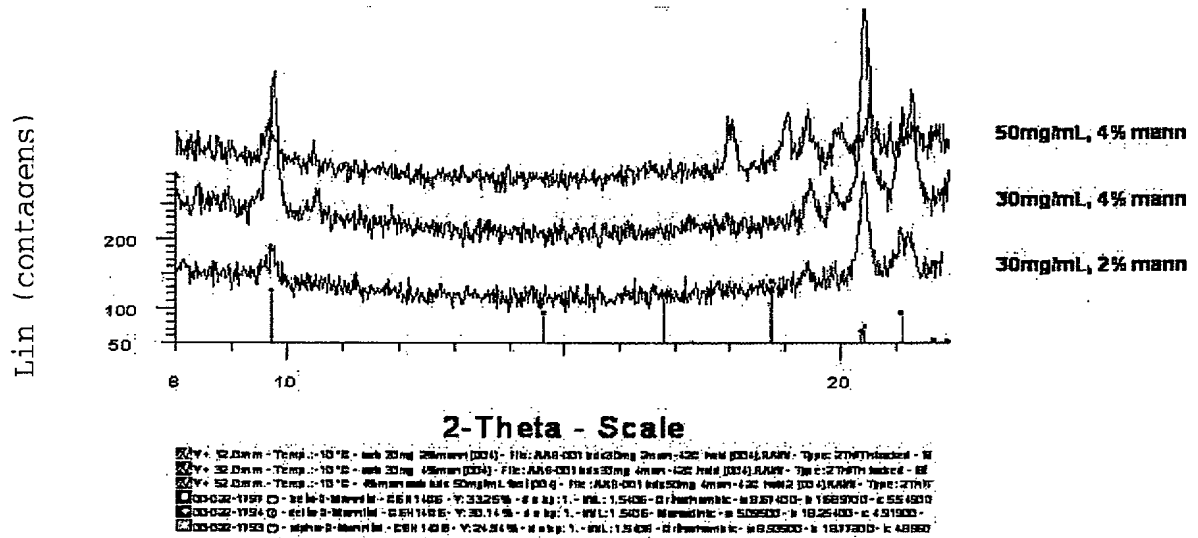
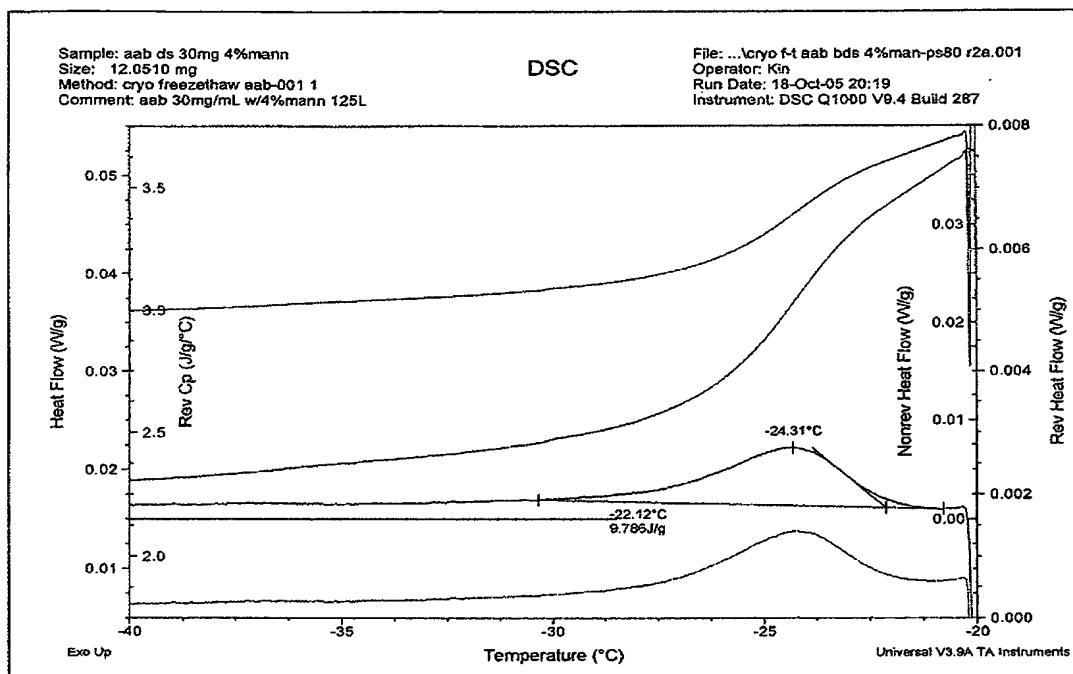


Figura 2



Temperatura (°C)

Figura 3

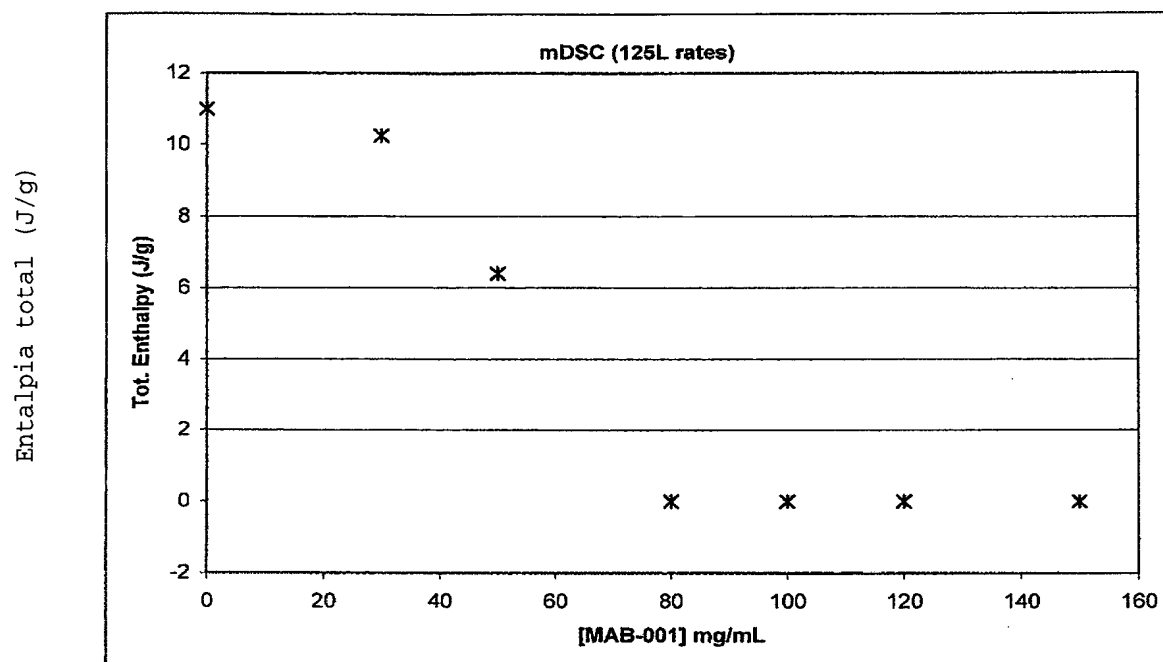


Figura 4

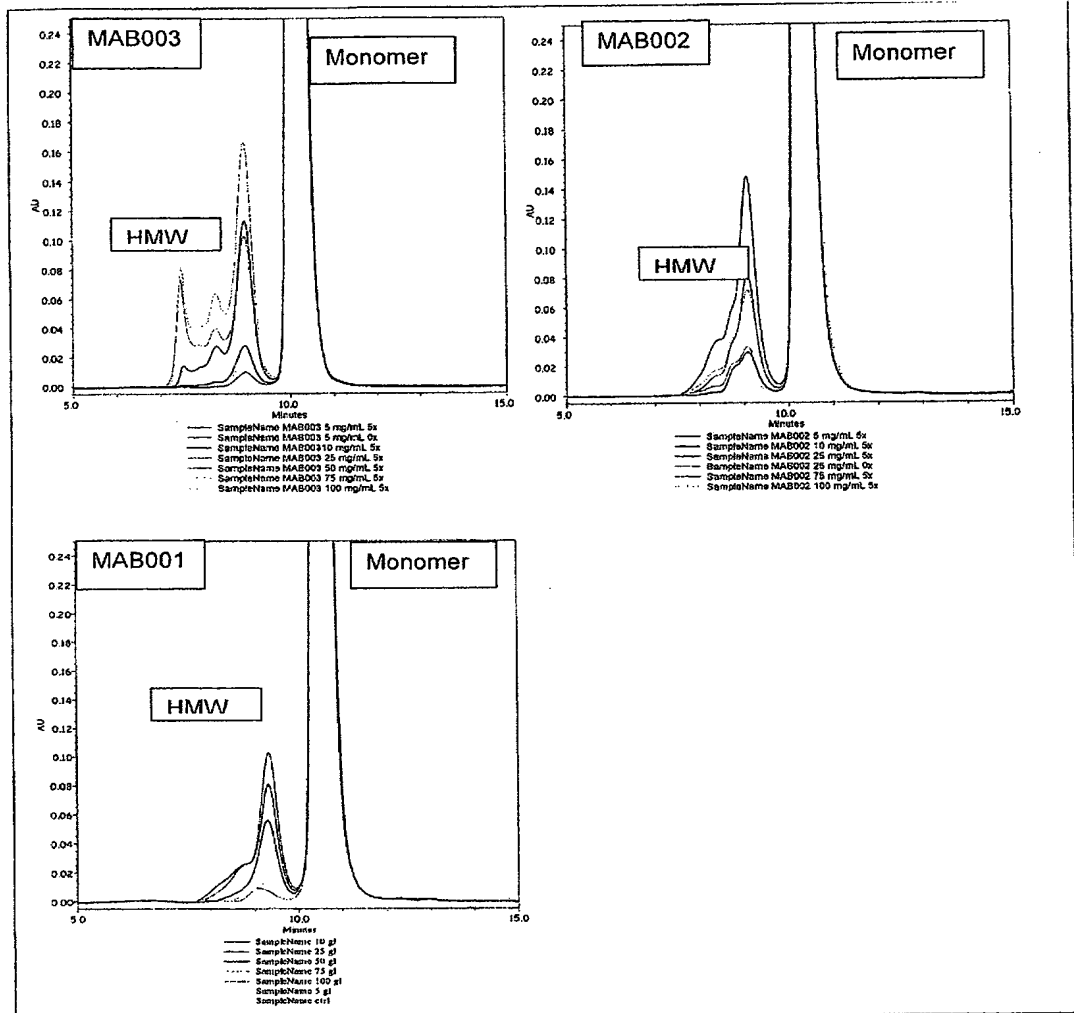


Figura 5

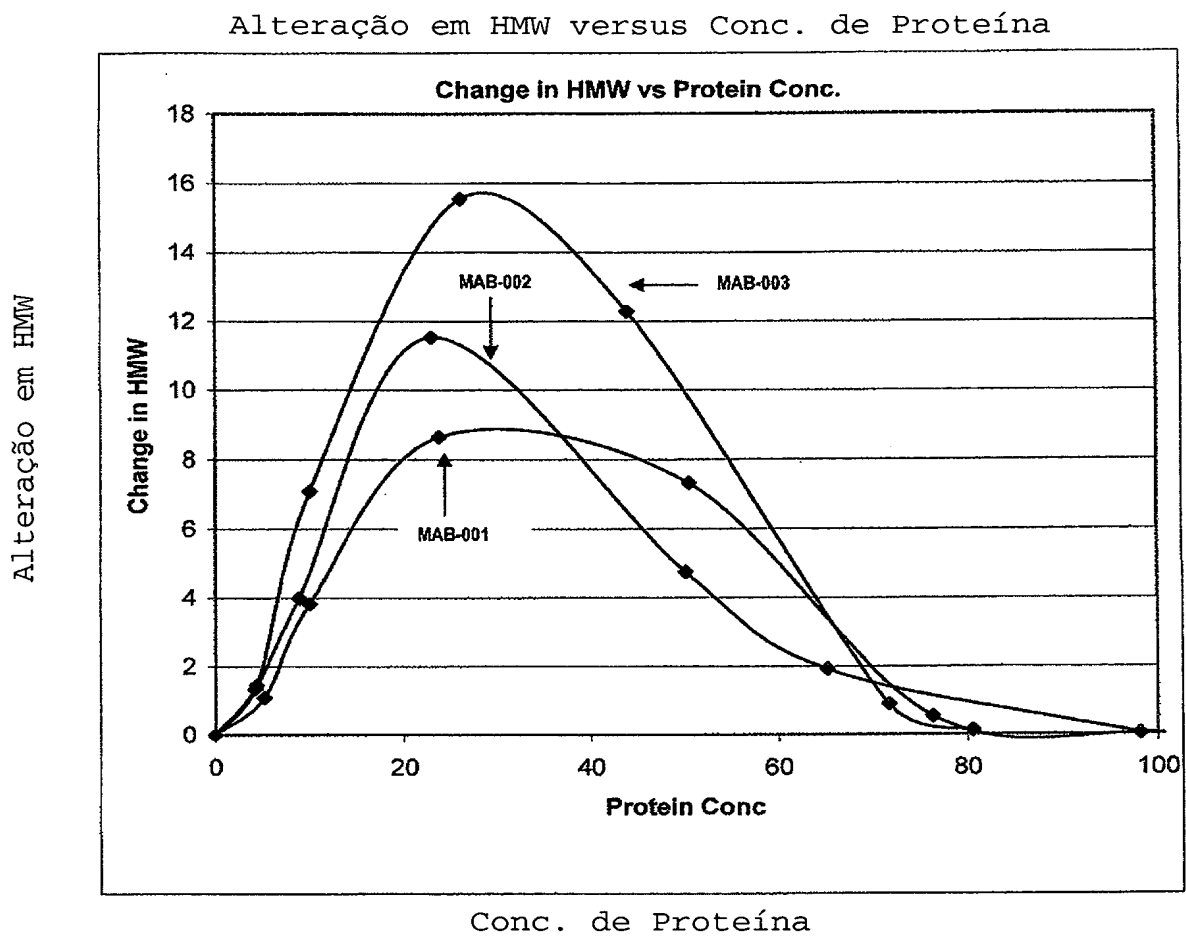
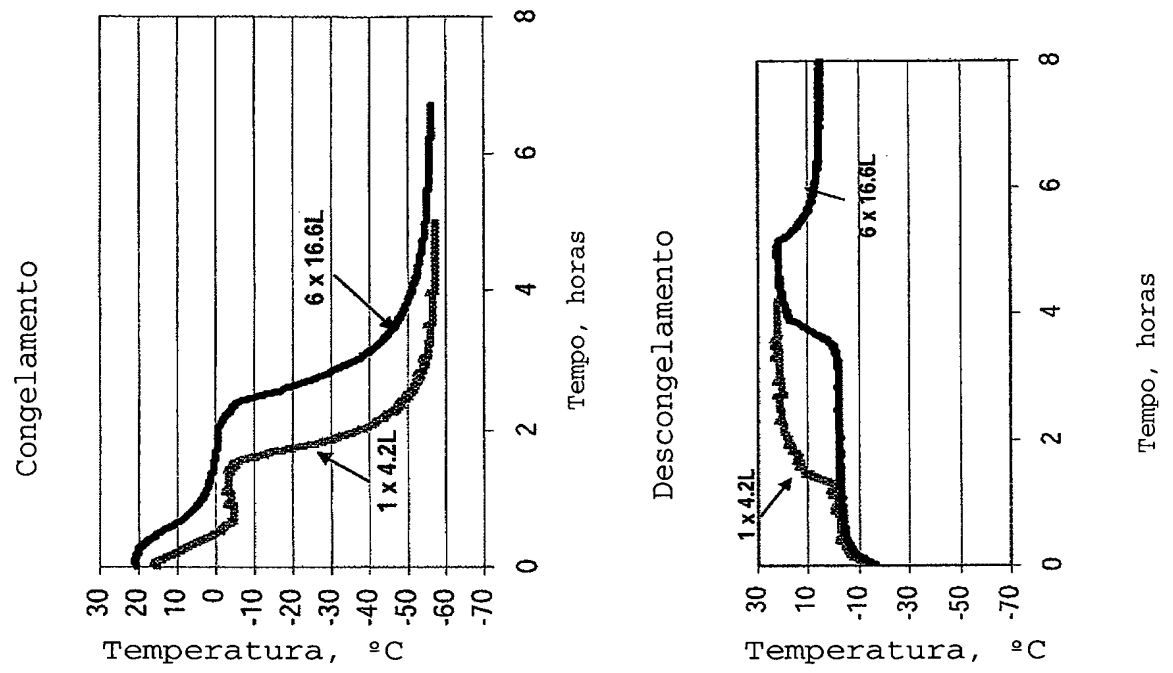


Figura 6

**Figura 7**

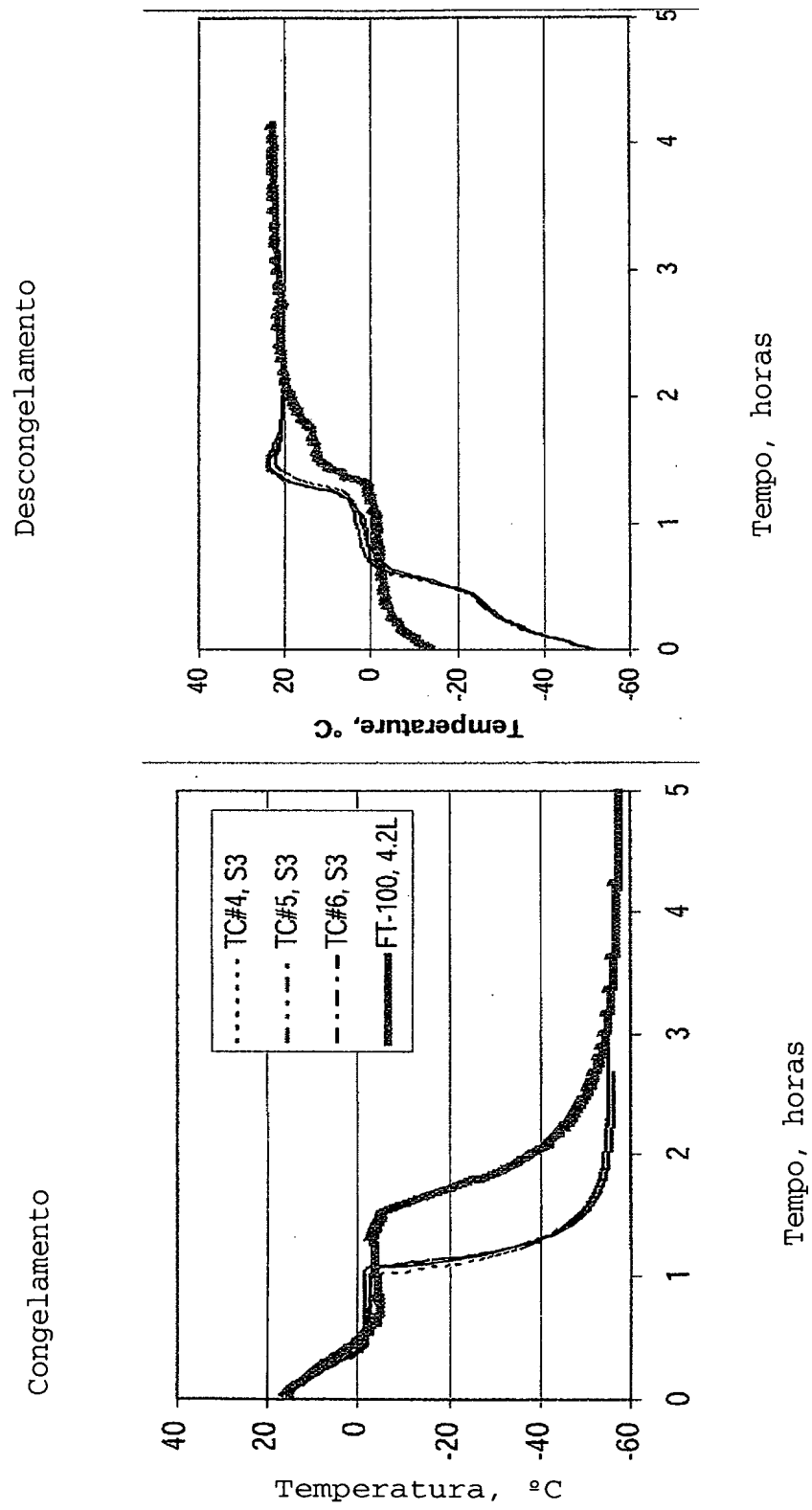


Figura 8

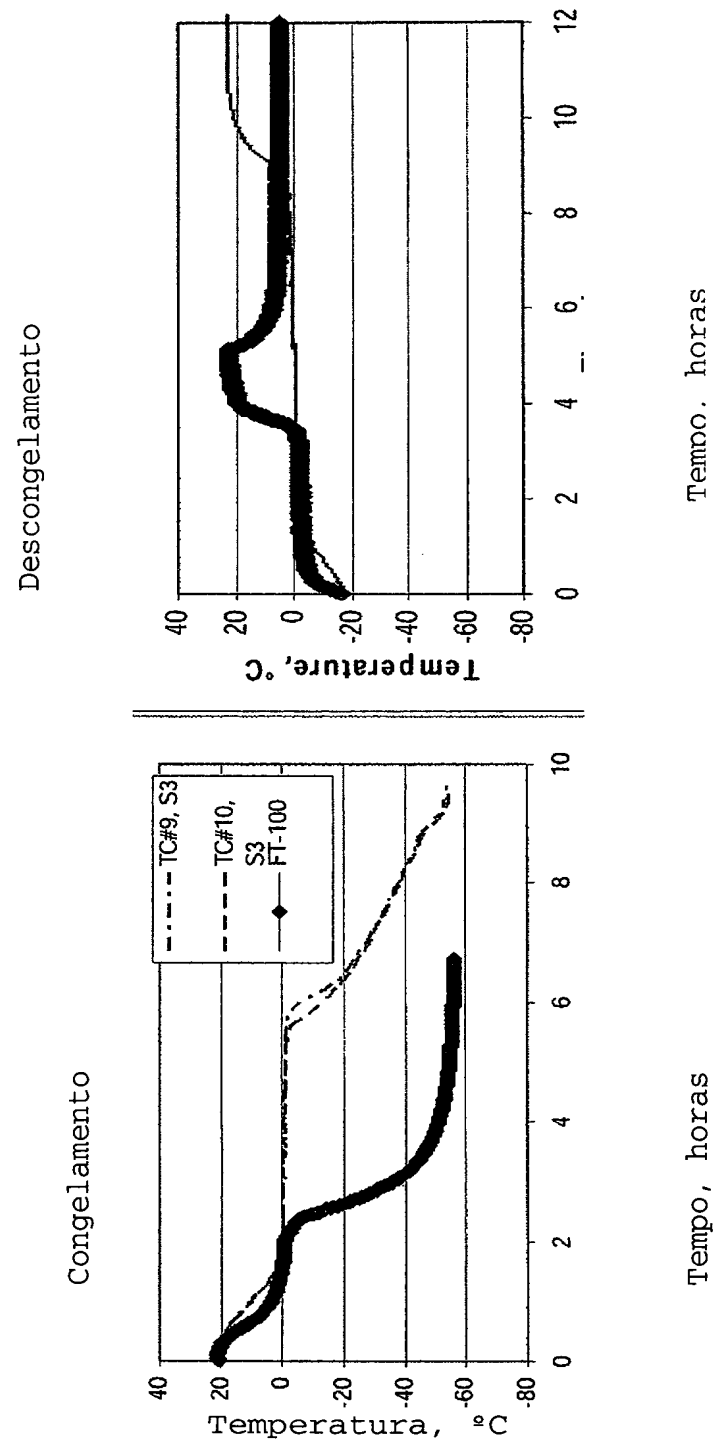


Figura 9

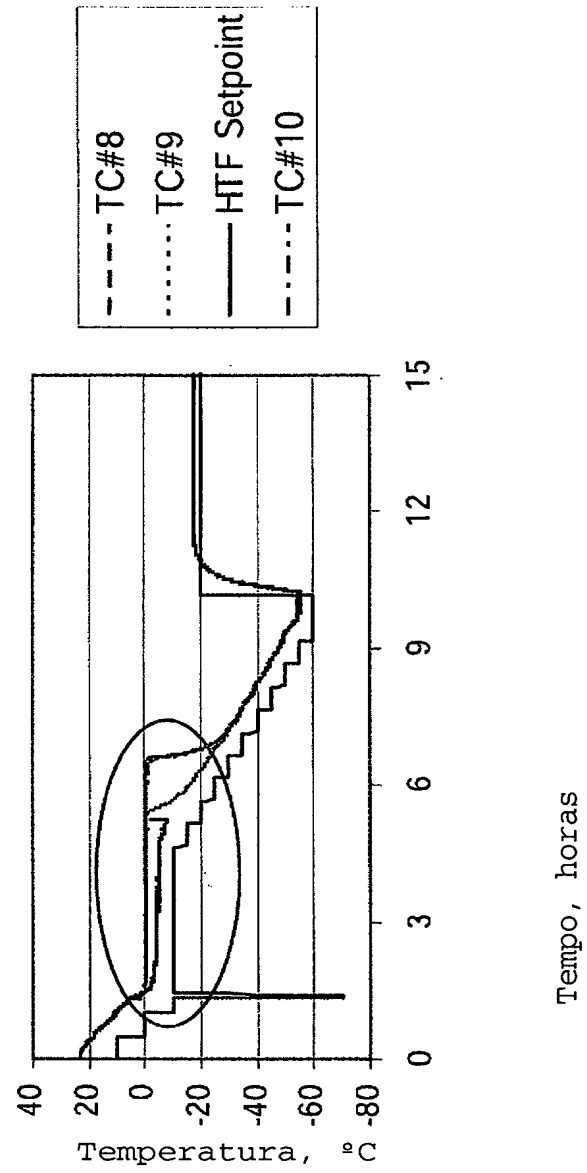
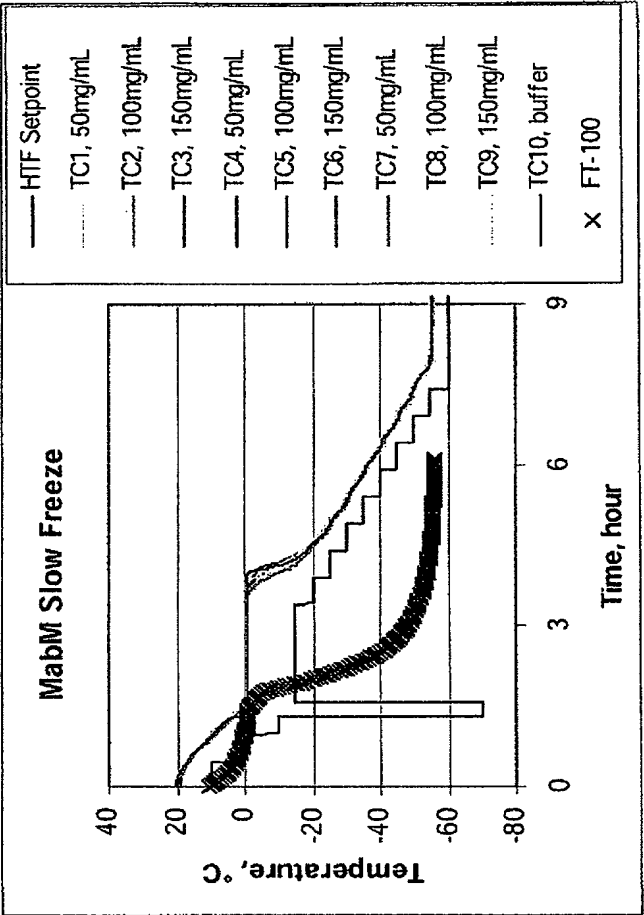


Figura 10

Congelamento Lento de MabM

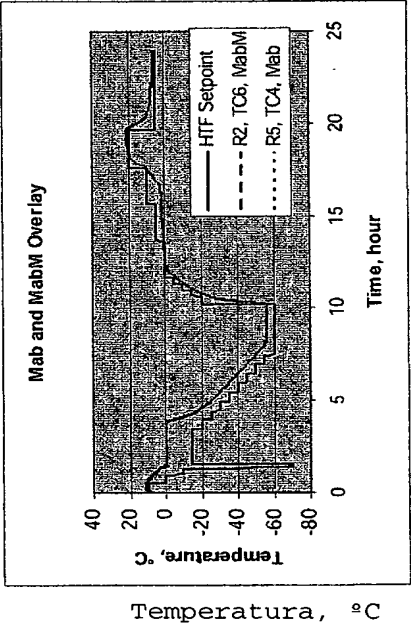


Tempo, horas

Perfil revisado usado com MabM para estudos F/T

Figura 11

Superposição de Mab e MabM



• No supercooling observed

Nenhum super-resfriamento observado

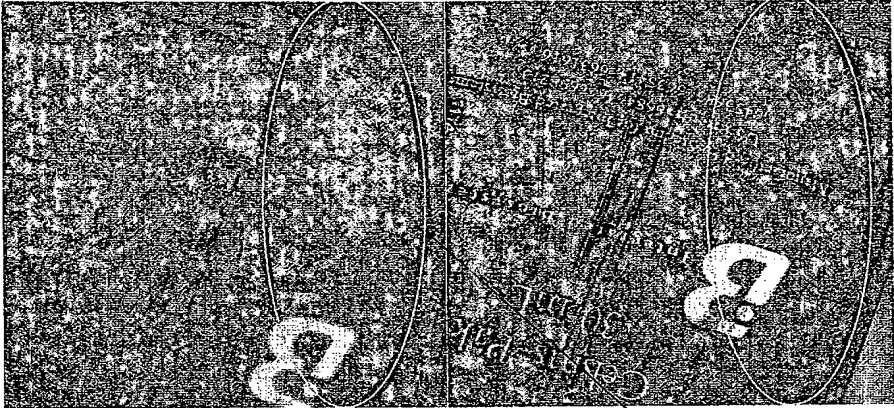
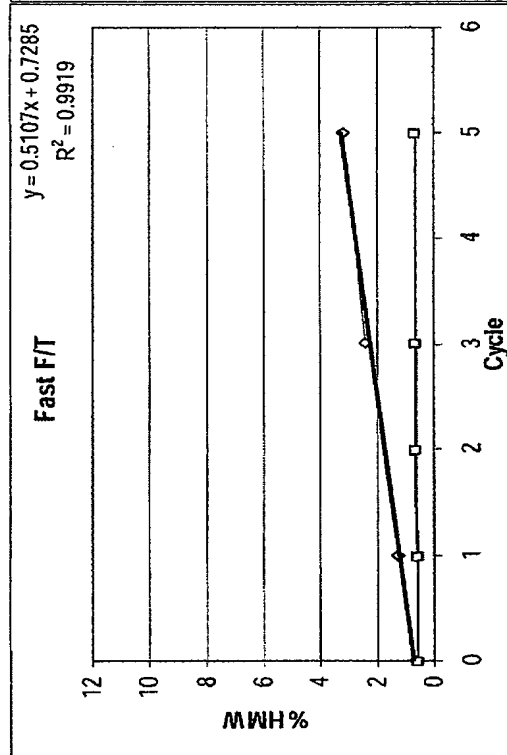


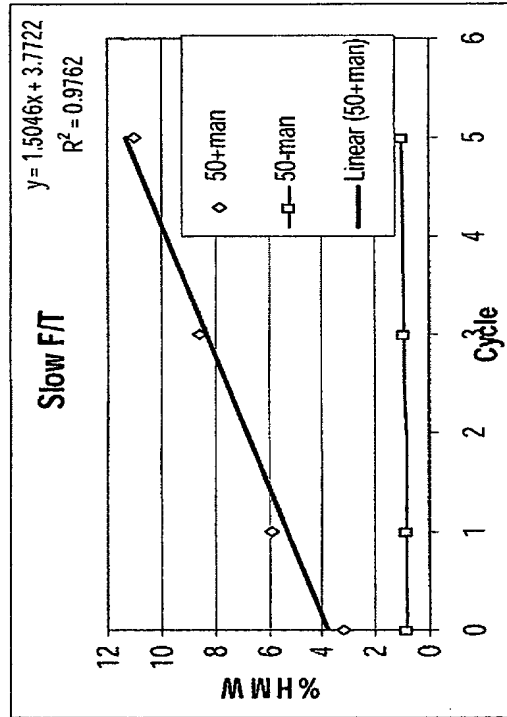
Figura 12

F/T Rápido



Ciclo

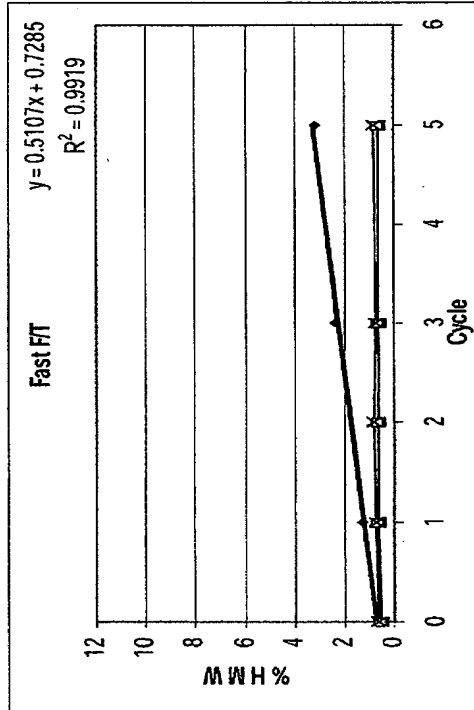
F/T Lento



Ciclo

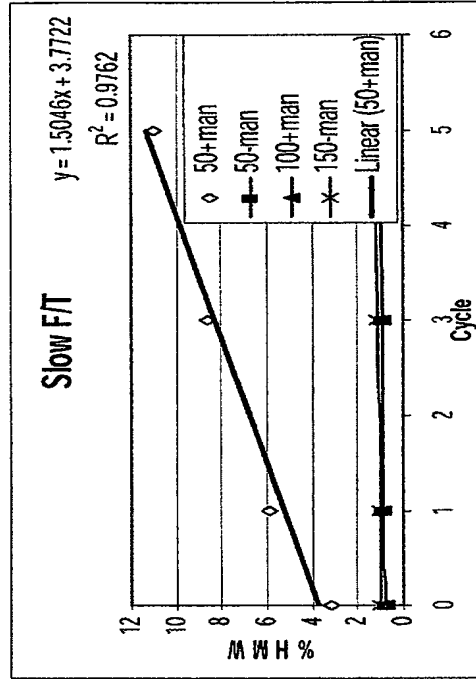
Figura 13

F/T Rápido



Ciclo

F/T Lento



Ciclo

Figura 14

RESUMO

"MÉTODO PARA ARMAZENAR UMA FORMULAÇÃO LÍQUIDA; MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO LÍQUIDA; COMPOSIÇÃO; E MÉTODO PARA INIBIR A AGREGAÇÃO
5 INDUZIDA POR MANITOL DE UMA PROTEÍNA EM UMA FORMULAÇÃO LÍQUIDA"

A presente invenção apresenta um método para inibir a agregação induzida por manitol de uma proteína em uma formulação líquida por aumento da concentração
10 de proteína a uma quantidade maior que 50 mg/mL. A presente invenção também apresenta métodos para armazenar e preparar uma formulação líquida contendo manitol e uma concentração de proteína maior que 50 mg/mL.