



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

(21) BR 112021015790-5 A2



(22) Data do Depósito: 03/03/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 05/10/2021

(54) Título: ALBUMINA DE SORO HUMANO EM FORMULAÇÕES

(51) Int. Cl.: A61K 9/00; A61K 9/08; A61K 39/00; A61K 47/26; A61K 47/42.

(30) Prioridade Unionista: 05/03/2019 US 62/813,843.

(71) Depositante(es): REGENERON PHARMACEUTICALS, INC..

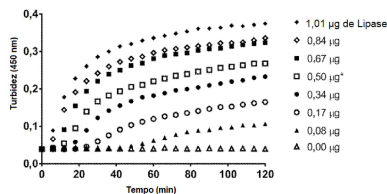
(72) Inventor(es): DOROTHY KIM; MICHAEL MARLOW.

(86) Pedido PCT: PCT US2020020752 de 03/03/2020

(87) Publicação PCT: WO 2020/180850 de 10/09/2020

(85) Data da Fase Nacional: 11/08/2021

(57) Resumo: ALBUMINA DE SORO HUMANO EM FORMULAÇÕES. A presente invenção refere-se a formulações medicamentosas e a métodos para remover, reduzir ou prevenir a formação de partículas de ácido graxo em formulações medicamentosas.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"ALBUMINA DE SORO HUMANO EM FORMULAÇÕES"**.

CAMPO

[001] A presente invenção refere-se, em geral, a métodos para remover, reduzir ou prevenir a formação de partículas de ácido graxo em formulações de fármaco.

FUNDAMENTOS

[002] Há muitos desafios em projetar formulações de fármaco a fim de melhorar sua fabricação, armazenamento, manipulação e características de administração enquanto também minimizam efeitos colaterais indesejáveis. Por exemplo, o desenvolvimento de formulação busca identificar as condições de solução e aditivos ou excipientes que aumentam a estabilidade e reduzem a ocorrência de mudanças químicas ou físicas que resultam frequentemente em agregação, e podem levar subsequentemente a um aumento em partículas subvisíveis ou visíveis.

[003] A prevenção e a redução da formação de partículas em produtos de fármaco injetáveis formulados foram particularmente desafiadoras e o foco de debate e investigação com a indústria farmacêutica por diversos anos. Consistindo em materiais sintéticos ou biológicos e se originando de várias fontes, as partículas que são visíveis ou até mesmo subvisíveis podem elevar o potencial para imunogenicidade em pacientes e podem ter efeitos variáveis na qualidade de produto de fármaco. Uma tal impureza possível pode ser partículas de ácido graxo que são formadas durante a fabricação, transporte, armazenamento, manipulação ou administração. As partículas de ácido graxo podem causar efeitos imunogênicos potencialmente adversos e prejudicar a vida de prateleira.

[004] Será observado que existe uma necessidade por métodos melhorados para reduzir ou prevenir a formação de partículas de ácido

graxo em formulações de proteína e para formulações de proteína que têm nível reduzido de partículas de ácido graxo.

SUMÁRIO

[005] Manter a estabilidade de formulações de fármaco, não apenas durante o armazenamento, mas também durante a fabricação, transporte, manipulação e administração, é um grande desafio. Entre produtos de fármaco, a bioterapêutica de proteína ganha popularidade devido ao seu sucesso e versatilidade. As proteínas terapêuticas são a classe de crescimento mais rápido de fármacos e compõem cerca de um terço do mercado de fármaco. Um dos desafios principais para desenvolvimento de bioterapêutica de proteína é superar a estabilidade limitada das proteínas que pode ser afetada por presença de partículas visíveis e subvisíveis. Isso é devido a preocupações crescentes sobre a imunogenicidade potencial de partículas-tanto proteínas quanto partículas não proteínicas. A mitigação da formação de tais partículas pode ser uma etapa importante no desenvolvimento de formulação de fármaco. Um exemplo de um desafio é impedir ou reduzir a formação de partículas de ácido graxo em formulações.

[006] A divulgação fornece um método para impedir ou reduzir a formação de partículas de ácido graxo em uma formulação.

[007] Em uma modalidade exemplificativa, o método para prevenir ou reduzir a formação de partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo.

[008] Em um aspecto dessa modalidade, o método para prevenir ou reduzir a formação de partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana em uma quantidade eficaz a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo

[009] Em um aspecto dessa modalidade, o método para prevenir ou reduzir a formação de partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo, em que a formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo pode compreender polissorbato.

[0010] Em um aspecto dessa modalidade, o método para prevenir ou reduzir a formação de partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar a albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo, em que a formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo compreende polissorbato selecionado do grupo que consiste em polissorbato 20, polissorbato 40, polissorbato 60, polissorbato 80 e combinações dos mesmos.

[0011] Em um aspecto dessa modalidade, o método para prevenir ou reduzir a formação de partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo, em que a formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo compreende cerca de 0,001% em p/v a cerca de 1% em p/v de polissorbato.

[0012] Em um aspecto dessa modalidade, o método para prevenir ou reduzir a formação de partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo, em que a formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo compreende polissorbato e pelo menos uma proteína.

[0013] Em um aspecto dessa modalidade, o método para prevenir ou reduzir a formação de partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma for-

mulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo, em que a formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo compreende polissorbato e um anticorpo.

[0014] Em um aspecto dessa modalidade, o método para prevenir ou reduzir a formação de partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo, em que as partículas de ácido graxo compreendem ácidos graxos livres.

[0015] Em um aspecto dessa modalidade, o método para prevenir ou reduzir a formação de partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo, em que as partículas de ácido graxo compreendem ácidos graxos livres e em que uma razão de moléculas de ácido graxo livre a moléculas da albumina sérica humana podem ser cerca de 6:1 a cerca de 1:1.

[0016] Em um aspecto dessa modalidade, o método para prevenir ou reduzir a formação de partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo, em que as partículas de ácido graxo compreendem ácidos graxos livres selecionados do grupo que consiste em ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico e combinações dos mesmos.

[0017] Em um aspecto dessa modalidade, o método para prevenir ou reduzir a formação de partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo, em que a formulação pode compreender pelo menos cerca de 5,5 mg/ml da albumina sérica humana.

[0018] Em um aspecto dessa modalidade, o método para prevenir

ou reduzir a formação de partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo, em que a formulação pode ser uma formulação parenteral.

[0019] Em um aspecto dessa modalidade, o método para prevenir ou reduzir a formação de partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo, em que as partículas de ácido graxo são partículas visíveis ou subvisíveis.

[0020] Em um aspecto dessa modalidade, o método para prevenir ou reduzir a formação de partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo, em que as partículas de ácido graxo podem ser detectáveis por espectroscopia de Raman.

[0021] A divulgação, pelo menos em parte, fornece um método para solubilizar partículas de ácido graxo em uma formulação.

[0022] Em uma modalidade exemplificativa, o método para solubilizar partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo.

[0023] Em um aspecto dessa modalidade, o método para solubilizar partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar uma quantidade eficaz da albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo.

[0024] Em um aspecto dessa modalidade, o método para solubilizar partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo, em que a formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo pode compreender po-

lissorbato.

[0025] Em um aspecto dessa modalidade, o método para solubilizar partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo, em que a formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo pode compreender polissorbato selecionado do grupo que consiste em polissorbato 20, polissorbato 40, polissorbato 60, polissorbato 80 e combinações dos mesmos.

[0026] Em um aspecto dessa modalidade, o método para solubilizar partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo, em que a formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo pode compreender cerca de 0,001% em p/v a cerca de 1% em p/v de polissorbato.

[0027] Em um aspecto dessa modalidade, o método para solubilizar partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo, em que a formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo pode compreender polissorbato e pelo menos uma proteína.

[0028] Em um aspecto dessa modalidade, o método para solubilizar partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo, em que a formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo compreende polissorbato e um anticorpo.

[0029] Em um aspecto dessa modalidade, o método para solubilizar partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma formulação com capacidade

para formar partículas de ácido graxo, em que as partículas de ácido graxo podem compreender ácidos graxos livres.

[0030] Em um aspecto dessa modalidade, o método para solubilizar partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo, em que as partículas de ácido graxo podem compreender ácidos graxos livres e em que uma razão de moléculas de ácido graxo livre a moléculas da albumina sérica humana pode ser cerca de 6:1 a cerca de 1:1.

[0031] Em um aspecto dessa modalidade, o método para solubilizar partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo, em que as partículas de ácido graxo podem compreender ácidos graxos livres selecionados do grupo que consiste em ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico e combinações dos mesmos.

[0032] Em um aspecto dessa modalidade, o método para solubilizar partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar pelo menos albumina sérica humana de cerca de 5,5 mg/ml a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo

[0033] Em um aspecto dessa modalidade, o método para solubilizar partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo, em que a formulação pode ser uma formulação parenteral.

[0034] Em um aspecto dessa modalidade, o método para solubilizar as partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo, em que as partículas de

ácido graxo são partículas visíveis ou subvisíveis.

[0035] Em um aspecto dessa modalidade, o método para solubilizar partículas de ácido graxo em uma formulação pode compreender adicionar albumina sérica humana a uma formulação com capacidade para formar partículas de ácido graxo, em que as partículas de ácido graxo são detectáveis por espectroscopia de Raman.

[0036] Essa divulgação, pelo menos em parte, fornece uma formulação que compreende (i) um agente farmacêutico ativo e (ii) albumina sérica humana.

[0037] Em uma modalidade exemplificativa, a formulação pode compreender (i) um agente farmacêutico ativo, (ii) albumina sérica humana e (iii) um polissorbato.

[0038] Em um aspecto dessa modalidade, a formulação pode compreender (i) um anticorpo, (ii) albumina sérica humana e (iii) um polissorbato.

[0039] Em um aspecto dessa modalidade, a formulação pode compreender (i) um agente farmacêutico ativo, (ii) albumina sérica humana e (iii) um polissorbato selecionado do grupo que consiste em polissorbato 20, polissorbato 40, polissorbato 60, polissorbato 80 ou combinações dos mesmos.

[0040] Em um aspecto dessa modalidade, a formulação pode compreender (i) um anticorpo, (ii) albumina sérica humana e (iii) um polissorbato, em que a formulação pode ser administrada por rota parenteral.

[0041] Em um aspecto dessa modalidade, a formulação pode compreender (i) um anticorpo, (ii) albumina sérica humana, (iii) um polissorbato e (iv) uma enzima lipase.

[0042] Em um aspecto dessa modalidade, a formulação pode compreender (i) um agente farmacêutico ativo e (ii) pelo menos cerca de 5,5 mg/ml da albumina sérica humana.

[0043] Em um aspecto dessa modalidade, a formulação pode compreender (i) um agente farmacêutico ativo, (ii) pelo menos cerca de 5,5 mg/ml da albumina sérica humana, e (iii) cerca de 0,001% em p/v a cerca de 1% em p/v de polissorbato.

[0044] Em um aspecto dessa modalidade, a formulação pode compreender (i) um agente farmacêutico ativo, (ii) albumina sérica humana e (iii) um polissorbato, em que a formulação pode compreender adicionalmente partículas de ácido graxo que têm ácidos graxos livres e em que uma razão entre moléculas do ácido graxo livre e moléculas da albumina sérica humana podem ser cerca de 6:1 a cerca de 1:1.

[0045] Em um aspecto dessa modalidade, a formulação pode compreender (i) um anticorpo, (ii) albumina sérica humana e (iii) um polissorbato, em que o polissorbato pode degradar para formar partículas de ácido graxo.

[0046] Em um aspecto dessa modalidade, a formulação pode compreender (i) um anticorpo, (ii) albumina sérica humana, (iii) um polissorbato e (iv) uma enzima lipase, em que a enzima lipase pode hidrolisar o polissorbato para formar partículas de ácido graxo.

[0047] Em um aspecto dessa modalidade, a formulação pode compreender (i) um anticorpo, (ii) albumina sérica humana e (iii) um polissorbato, em que a formulação pode compreender adicionalmente partículas de ácido graxo.

[0048] Em um aspecto dessa modalidade, a formulação pode compreender (i) um anticorpo, (ii) albumina sérica humana e (iii) um polissorbato, em que a formulação pode compreender adicionalmente partículas de ácido graxo que incluem ácidos graxos livres.

[0049] Em um aspecto dessa modalidade, a formulação pode compreender (i) um anticorpo, (ii) albumina sérica humana, e (iii) um polissorbato, em que a formulação pode compreender adicionalmente

partículas de ácido graxo que incluem ácidos graxos alifáticos com cerca de seis a cerca de vinte e dois carbonos.

[0050] Em um aspecto dessa modalidade, a formulação pode compreender (i) um anticorpo, (ii) albumina sérica humana, e (iii) um polissorbato, em que a formulação pode compreender adicionalmente partículas de ácido graxo que incluem ácido oleico.

[0051] Em um aspecto dessa modalidade, a formulação pode compreender (i) um anticorpo, (ii) albumina sérica humana e (iii) um polissorbato, em que a formulação pode compreender adicionalmente partículas de ácido graxo que incluem ácidos graxos livres selecionados de ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico e combinações dos mesmos.

[0052] Esses e outros aspectos da invenção serão mais bem observados e entendidos quando considerados em combinação com a seguinte descrição e os desenhos anexos. A seguinte descrição, embora indique várias modalidades e vários detalhes específicos dos mesmos, é dada a título de ilustração e não de limitação. Muitas substituições, modificações, adições ou redistribuições podem ser feitos no escopo da invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0053] A Figura 1 mostra um gráfico de absorbância em 450 nm como uma função de tempo para concentração de lipase para avaliar a capacidade de *lipase de Chromobacterium viscosum* para gerar partículas de ácido graxo promovendo-se a degradação de PS80, de acordo com uma modalidade exemplificativa.

[0054] A Figura 2 mostra o gráfico de intensidade de Raman (a.u.) como uma função de deslocamento de Raman (1/cm) para identificar a composição de partículas atribuídas a ácidos graxos que foram preparados de acordo com uma modalidade exemplificativa.

[0055] A Figura 3 mostra o gráfico de absorbância em 450 nm co-

mo uma função de tempo para várias concentrações de FAF-HSA adicionadas à solução que contém polissorbato preparada de acordo com uma modalidade exemplificativa.

[0056] A Figura 4 mostra o gráfico de absorvância em 450 nm como uma função de tempo para várias concentrações de SA-HSA adicionadas à solução que contém polissorbato preparada de acordo com uma modalidade exemplificativa.

[0057] A Figura 5 mostra um gráfico de absorvância em 450 nm como uma função de tempo para várias concentrações de IgG policlonal sem a adição de HSA.

[0058] A Figura 6 mostra um gráfico de absorvância em 450 nm como uma função de tempo para formulações que compreendem um anticorpo monoclonal que não é liofilizado (painel A) e liofilizado (painel B).

[0059] A Figura 7 mostra um gráfico de absorvância em 450 nm como uma função de tempo além de FAF-HSA 4,5 mg/ml (painel A) e FAF-HSA 7,5 mg/ml (painel B) para várias concentrações de IgG policlonal, de acordo com uma modalidade exemplificativa.

[0060] A Figura 8 mostra um gráfico de absorvância em 450 nm como uma função de tempo para várias concentrações de soro adicionadas às partículas de ácido graxo pré-formadas de acordo com uma modalidade exemplificativa.

[0061] A Figura 9 mostra um gráfico de absorvância em 450 nm como uma função de tempo para formulações que compreendem soro humano e partículas de ácido graxo livre pré-formadas em solução.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0062] Entre produtos de fármaco, produtos bioterapêuticos à base de proteína são uma classe importante de fármacos que oferecem um alto nível de seletividade, potência e eficácia, conforme evidenciado pelo aumento considerável em testes clínicos com anticorpos mono-

clonais (mAbs) pelos últimos anos. Trazer um produto bioterapêutico à base de proteína à clínica pode ser um projeto de muitos anos que necessita de esforços coordenados ao longo de várias disciplinas de desenvolvimento e pesquisa, incluindo constatação, desenvolvimento de formulação e processo, caracterização analítica e toxicologia pré-clínica e farmacologia. Um aspecto crítico para um produto bioterapêutico clinicamente e comercialmente viável é a estabilidade do produto de fármaco em termos do processo de fabricação, assim como a vida de prateleira. Similar a muitas proteínas purificadas, a estabilidade conformacional nativa de mAbs é relativamente marginal, tipicamente na ordem de 20-25 kcal/mol (Kristi L. Lazar, Thomas W. Patapoff & Vikas K. Sharma, *Cold denaturation of monoclonal antibodies*, 2 MABS 42–52 (2010)). Isso frequentemente necessita de etapas apropriadas para auxiliar no aumento de estabilidade física e química de mAb pelas condições diferentes de solução e ambientes necessários para a fabricação e armazenamento com impacto mínimo em qualidade de produto, incluindo identificar moléculas com estabilidade inerente maior, manipulação de proteína, e desenvolvimento de formulação. O desenvolvimento de formulação busca identificar condições de solução e aditivos ou excipientes que aumentam a estabilidade de mAb e reduzem a ocorrência de mudanças químicas ou físicas que resultam frequentemente em agregação e podem levar subsequentemente a um aumento em partículas subvisíveis ou visíveis.

[0063] As partículas subvisíveis ou visíveis, particularmente em produtos de fármaco formulados, têm sido o foco de debate e investigação na indústria farmacêutica por diversos anos e podem constituir um problema de qualidade. Consistindo em materiais sintéticos ou biológicos e originando de várias fontes, as partículas trazem o potencial por efeitos imunogênicos em pacientes (S. Bukofzer et al., *Industry Perspective on the Medical Risk of Visible Particles in Injectable Drug*

Products, 69 PDA JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCE E TECHNOLOGY 123–139 (2015); S. E. Langille, *Particulate Matter in Injectable Drug Products*, 67 PDA JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCE E TECHNOLOGY 186–200 (2013)) e podem ter efeitos diferentes no produto de fármaco. Pode haver diversas causas para a formação de partículas visíveis e subvisíveis em uma formulação, que pode incluir partículas proteínicas e partículas não proteínicas. Tais partículas podem levar a problemas crescentes em relação à imunogenicidade potencial. Até mesmo a Farmacopeia dos Estados Unidos (USP) e a Farmacopeia Europeia (Ph. Eur.) definem atualmente os limites de concentração em soluções parenterais apenas para partículas maiores do que 10 µm, autoridades regulatórias esperam crescentemente a caracterização quantitativa de partículas de microns de 1 a 10 µm e a caracterização qualitativa de partículas de submicrons de 100 nm a 1000 nm já em estágios iniciais da fase de desenvolvimento (USP <788>. In: The United States Pharmacopoeia, National Formulary. 2009; Ph.Eur. 2.9.19).

[0064] As partículas visíveis e subvisíveis em formulações de fármaco podem ser relacionadas ao teor de ácido graxo livre e formação de partícula de ácido graxo subsequente. Os ácidos graxos livres e a formação de partícula de ácido graxo relacionada podem ocorrer em formulações de proteína que compreendem polissorbatos. Mais do que setenta por cento de produtos terapêuticos de anticorpo monoclonal comercializados contêm entre 0,001% e 0,1% polissorbato para proteger a proteína contra estresses interfaciais, como adsorção e agregação. Muitas preparações de polissorbatos contêm uma mistura de várias cadeias de ácido graxo; por exemplo, polissorbato 80 contém ácidos graxos oleico, palmítico, mirístico e esteárico, com a fração de mono-oleato compondo aproximadamente 58% da mistura polidispersa (Nitin Dixit et al., *Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate*

20 Degradation in a Sulfatase Drug Product Leading to Free Fatty Acid Particles, 105 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1657–1666 (2016)). Polissorbatos são suscetíveis à auto-oxidação de maneira dependente de pH e temperatura e, adicionalmente, a exposição à luz UV também pode produzir a instabilidade (Ravuri S.k. Kishore et al., *Degradation of Polysorbates 20 e 80: Studies on Thermal Autoxidation and Hydrolysis*, 100 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 721–731 (2011)), resultando em ácidos graxos livres em solução juntamente com o grupo cabeça de sorbitano. Desse modo, polissorbatos podem contribuir para a formação de partícula devido à auto-oxidação e hidrólise, o que resulta em ácidos graxos livres e formação de partícula de ácido graxo subsequente. A hidrólise de polissorbato por várias proteínas de célula hospedeira, como fosfolipase B do tipo 2 (PLBL2) e lipoproteína lipase (Josephine Chiu et al., *Knockout of a difficult-to-remove CHO host cell protein, lipoprotein lipase, for improved polysorbate stability in monoclonal antibody formulations*, 114 BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING 1006–1015 (2016)), pode originar ácidos graxos livres sob certas condições (Nitin Dixit et al., *Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20 Degradation in a Sulfatase Drug Product Leading to Free Fatty Acid Particles*, 105 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1657–1666 (2016)). Esses ácidos graxos livres e, de modo similar, os ácidos graxos de cadeia longa (estearato, oleato, palmitato, entre outros) que resultam da degradação de PS20 precipitam devido à baixa solubilidade (Nidhi Doshi, Barthélemy Demeule & Sandeep Yadav, *Understanding Particle Formation: Solubility of Free Fatty Acids as Polysorbate 20 Degradation Byproducts in Therapeutic Monoclonal Antibody Formulations*, 12 MOLECULAR PHARMACEUTICS 3792–3804 (2015); Steven R. Labrenz, *Ester Hydrolysis of Polysorbate 80 in mAb Drug Product: Evidence in Support of the Hypothesized Risk After the Observation of Visible Particulate in mAb Formulations*, 103 JOURNAL

OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 2268–2277 (2014)), que, no modelo atual, pode levar potencialmente à formação de partícula de ácido graxo em fármaco.

[0065] Diversos relatos detalharam a presença de partículas visíveis e subvisíveis em produtos de fármaco que contêm polissorbato 20 ou polissorbato 80 (Xiaolin Cao et al., *Free Fatty Acid Particles in Protein Formulations, Part 1: Microspectroscopic Identification*, 104 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 433–446 (2015); Christine C. Siska et al., *Free Fatty Acid Particles in Protein Formulations, Part 2: Contribution of Polysorbate Raw Material*, 104 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 447–456 (2015); Nidhi Doshi, Barthélemy Demeule & Sandeep Yadav, *Understanding Particle Formation: Solubility of Free Fatty Acids as Polysorbate 20 Degradation Byproducts in Therapeutic Monoclonal Antibody Formulations*, 12 MOLECULAR PHARMACEUTICS 3792–3804 (2015); Nitin Dixit et al., *Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20 Degradation in a Sulfatase Drug Product Leading to Free Fatty Acid Particles*, 105 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1657–1666 (2016); Anthony Tomlinson et al., *Polysorbate 20 Degradation in Biopharmaceutical Formulations: Quantification of Free Fatty Acids, Characterization of Particulates, and Insights into the Degradation Mechanism*, 12 MOLECULAR PHARMACEUTICS 3805–3815 (2015); Troii Hall et al., *Polysorbates 20 and 80 Degradation by Group XV Lysosomal Phospholipase A 2 Isomer X1 in Monoclonal Antibody Formulations*, 105 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1633–1642 (2016)). As partículas caracterizadas por métodos espectroscópicos e que demonstraram ser compostas de ácidos graxos (Nidhi Doshi, Barthélemy Demeule & Sandeep Yadav, *Understanding Particle Formation: Solubility of Free Fatty Acids as Polysorbate 20 Degradation Byproducts in Therapeutic Monoclonal Antibody Formulations*, 12 MOLECULAR PHARMACEUTICS 3792–3804 (2015); Anthony Tomlinson et al.,

Polysorbate 20 Degradation in Biopharmaceutical Formulations: Quantification of Free Fatty Acids, Characterization of Particulates, and Insights into the Degradation Mechanism, 12 MOLECULAR PHARMACEUTICS 3805–3815 (2015), pure protein (Xiaolin Cao et al., *Free Fatty Acid Particles in Protein Formulations, Part 1: Microspectroscopic Identification*, 104 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 433–446 (2015)), ou uma mistura de ácidos graxos e proteína, sugeriram que a hidrólise de polissorbato pode ser diretamente contribuinte para o surgimento de partículas em produtos de fármaco formulados. As proteínas de célula hospedeira, especificamente lipases, são citadas como uma causa provavelmente principal (Nitin Dixit et al., *Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20 Degradation in a Sulfatase Drug Product Leading to Free Fatty Acid Particles*, 105 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1657–1666 (2016)). Desse modo, embora o padrão de Farmacopeia dos EUA (USP) para a proteína de hospedeira seja <100 ppm (Catalin Doneanu et al., *Analysis of host-cell proteins in biotherapeutic proteins by comprehensive online two-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry*, 4 MABS 24–44 (2012)), a presença de níveis mínimos de lipases de célula hospedeira pode levar à hidrólise de polissorbato, resultando na liberação de ácidos graxos de cadeia longa livres. Adicionalmente, os critérios para teor de partícula definidos pela USP define limites em 6000 partículas/recipiente que excede 10 µM em tamanho e em 600 partículas/recipiente que excede 25 µM em tamanho (USP Capítulo Geral 788, Particulate Matter in Injections), sugerindo que a presença de lipases de célula hospedeira pode impactar potencialmente a vida de prateleira (S. Bukofzer et al., *Industry Perspective on the Medical Risk of Visible Particles in Injectable Drug Products*, 69 PDA JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCE AND TECHNOLOGY 123–139 (2015)).

[0066] A homogeneidade de preparações de polissorbato, assim

como a estabilidade a longo prazo inerente de polissorbatos pode introduzir questões relacionadas ao teor de ácido graxo livre. Embora a segurança e eficácia de produtos de fármaco que contêm partículas de ácido graxo não tenha sido completamente avaliada, é claramente vantajoso evitar o potencial para problemas de qualidade. Embora não permaneça claro se as partículas de ácido graxo produzem uma resposta imunogênica em pacientes, particulados em produtos de fármaco, em geral, são considerados indesejáveis.

[0067] Na ausência de métodos conhecidos para mitigar a formação de partículas de ácido graxo ou solubilizar rápida e completamente as partículas pré-formadas, métodos eficazes e eficientes e formulações foram desenvolvidos conforme divulgado no presente documento. Um sistema experimental para gerar rapidamente partículas de ácido graxo e um uso inovador para albumina sérica humana no contexto de formulações bioterapêuticas também é divulgado.

[0068] A menos que descrito de outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados no presente documento têm o mesmo significado que o comumente entendido por um indivíduo de habilidade comum na técnica à qual essa invenção pertence. Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos no presente documento possam ser usados na prática ou teste, os métodos e materiais particulares são descritos agora. Todas as publicações mencionadas são incorporadas ao presente documento a título de referência.

[0069] O termo "um/uma" deve ser entendido como significando "pelo menos um"; e os termos "cerca de" e "aproximadamente" devem ser entendidos como permitindo a variação padrão conforme será entendido por aqueles de habilidade comum na técnica; e quando as faixas são fornecidas, pontos finais são incluídos.

[0070] Visto que a presença de partículas de ácido graxo em pro-

duto bioterapêuticos pode ser um problema substancial para companhias industriais, de companhias a reguladores a fornecedores e pacientes, os métodos para prevenir e/ou reduzir a formação de tais partículas de ácido graxo e formulações que podem ter nível reduzido de tais partículas de ácido graxo e/ou prevenir a formação de tais partículas de ácido graxo são importantes no desenvolvimento de fármaco farmacêutico.

[0071] Em algumas modalidades exemplificativas, a divulgação fornece uma formulação com um nível reduzido de partículas de ácido graxo e/ou com capacidade para prevenir a formação de tais partículas de ácido graxo que compreende um agente farmacêutico ativo.

[0072] Conforme usado no presente documento, o termo "formulação" se refere a um agente farmacêutico ativo que é formulado junto com um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis.

[0073] Conforme usado no presente documento, o termo "um agente farmacêutico ativo" pode incluir um componente biologicamente ativo de um produto de fármaco. Um agente farmacêutico ativo pode se referir a qualquer substância ou combinação de substâncias usadas em um produto de fármaco, destinada a fornecer atividade farmacológica ou ter efeito direto de outro modo no diagnóstico, cura, mitigação, tratamento ou prevenção de doença, ou ter efeito direto em restauração, correção ou modificação de funções fisiológicas em animais. Os métodos não limitantes para preparar um agente farmacêutico ativo podem incluir o uso de processo de fermentação, DNA recombinante, isolamento e recuperação de recursos naturais, síntese química ou combinações dos mesmos.

[0074] Em algumas modalidades exemplificativas, o agente farmacêutico ativo pode ser uma proteína.

[0075] Conforme usado no presente documento, o termo "proteína" pode incluir qualquer polímero de aminoácido que tem ligações de

amida covalentemente ligadas. As proteínas compreendem uma ou mais cadeias poliméricas de aminoácidos, geralmente conhecidas na técnica como "polipeptídeos". "Polipeptídeo" se refere a um polímero composto de resíduos de aminoácido, variantes estruturais de ocorrência natural relacionadas e análogos de ocorrência não natural sintéticos dos mesmos ligados por meio de ligações peptídicas, variantes estruturais de ocorrência natural relacionadas e análogos de ocorrência não natural sintéticos dos mesmos. "Peptídeos sintéticos ou polipeptídeos" se refere a um peptídeo ou polipeptídeo de ocorrência não natural. Peptídeos ou polipeptídeos sintéticos podem ser sintetizados, por exemplo, com o uso de um sintetizador de polipeptídeo automatizado. Vários métodos de síntese de peptídeo de fase sólida são conhecidos por aqueles versados na técnica. Uma proteína pode conter um ou múltiplos polipeptídeos para formar uma única biomolécula de funcionamento. Uma proteína pode conter qualquer uma das proteínas bioterapêuticas, proteínas recombinantes usadas em pesquisa ou terapia, proteínas armadilhas e outras proteínas de fusão de receptor Fc quimérico, proteínas quiméricas, anticorpos, anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos humanos e anticorpos biespecíficos. Em um outro aspecto exemplificativo, uma proteína pode incluir fragmentos de anticorpo, nanocorpos, quimeras de anticorpo recombinantes, citocinas, quimiocinas, hormônios de peptídeo e semelhantes. As proteínas podem ser produzidas com o uso de sistemas de produção à base de célula recombinante, como o sistema de baculovírus de inseto, sistemas de levedura (por exemplo, *Pichia* sp.), sistemas de mamíferos (por exemplo, células de CHO e derivados de CHO, como células CHO-K1). Para uma revisão recente que discute as proteínas bioterapêuticas e sua produção, consultar Ghaderi et al., "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation," (Darius Ghaderi et al., *Production*

platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation, 28 BIOTECHNOLOGY AND GENETIC ENGINEERING REVIEWS 147–176 (2012)). Em algumas modalidades, as proteínas compreendem modificações, adutos e outras porções químicas covalentemente ligadas. Essas modificações, adutos e porções químicas incluem, por exemplo, avidina, estreptavidina, biotina, glicanos (por exemplo, N-acetilgalactosamina, galactose, ácido neuramínico, N-acetilglucosamina, fucose, manose e outros monossacarídeos), PEG, poli-histidina, etiqueta FLAG, proteína de ligação de maltose (MBP), proteína de ligação de quitina (CBP), glutationa-S-transferase (GST) myc-epítipo, identificações fluorescentes e outros corantes e semelhantes. As proteínas podem ser classificadas com base nas composições e solubilidade e podem, desse modo, incluir proteínas simples, como proteínas globulares e proteínas fibrosas; proteínas conjugadas, como nucleoproteínas, glicoproteínas, mucoproteínas, cromoproteínas, fosfoproteínas, metaloproteínas e lipoproteínas; e proteínas derivadas, como, proteínas derivadas primárias e proteínas derivadas secundárias.

[0076] Em algumas modalidades exemplificativas, a proteína pode ser um anticorpo, um anticorpo biespecífico, um anticorpo multiespecífico, fragmento de anticorpo, anticorpo monoclonal ou combinações dos mesmos.

[0077] O termo "anticorpo", conforme usado no presente documento inclui moléculas de imunoglobulina que compreendem quatro cadeias de polipeptídeo, duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações de dissulfeto, assim como multímeros dos mesmos (por exemplo, IgM). Cada cadeia pesada compreende uma região variável de cadeia pesada (abreviada no presente documento como HCVR ou V_H) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada compreende três domí-

nios, C_{H1}, C_{H2} e C_{H3}. Cada cadeia leve compreende uma região variável de cadeia leve (abreviada no presente documento como LCVR ou V_L) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve compreende um domínio (C_{L1}). As regiões V_H e V_L podem ser adicionalmente subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDRs), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões de estrutura (FR). Cada V_H e V_L é composta de três CDRs e quatro FRs, dispostas de terminal amino a terminal carbóxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. Em modalidades diferentes da invenção, os FRs do anticorpo anti-big-ET-1 (ou porção de ligação ao antígeno do mesmo) podem ser idênticos às sequências de linha germinativa humana, ou podem ser natural ou artificialmente modificados. Uma sequência de consenso de aminoácidos pode ser definida com base em uma análise de lado a lado de duas ou mais CDRs.

[0078] O termo "anticorpo", conforme usado no presente documento, também inclui fragmentos de ligação ao antígeno de moléculas de anticorpo completo. Os termos "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo, "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo, e semelhantes, conforme usado no presente documento, incluem qualquer polipeptídeo ou glicoproteína de ocorrência natural, enzimaticamente obtível, sintético ou geneticamente manipulado que se liga especificamente a um antígeno para formar um complexo. Os fragmentos de ligação ao antígeno de um anticorpo podem ser derivados, por exemplo, de moléculas de anticorpo completo com o uso de quaisquer técnicas padrão adequadas, como digestão proteolítica ou técnicas de manipulação genética recombinante que envolvem a manipulação e expressão de variável de anticorpo de codificação de DNA e domínios opcionalmente constantes. Tal DNA é conhecido e/ou é

prontamente disponível de, por exemplo, fontes comerciais, bibliotecas de DNA (incluindo, por exemplo, bibliotecas de anticorpo de fago), ou pode ser sintetizado. O DNA pode ser sequenciado e quimicamente manipulado ou usando-se as técnicas de biologia molecular, por exemplo, para dispor um ou mais domínios variáveis e/ou constantes em uma configuração adequada, ou para introduzir códons, criar resíduos de cisteína, modificar, adicionar ou deletar aminoácidos, etc.

[0079] Conforme usado no presente documento, um "fragmento de anticorpo" inclui uma porção de um anticorpo intacto, como, por exemplo, a ligação ao antígeno ou região variável de um anticorpo. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem, mas sem limitação, um fragmento Fab, um fragmento Fab', um fragmento F(ab')₂, um fragmento scFv, um fragmento Fv, um diacorpo dsFv, um fragmento dAb, um fragmento Fd', um fragmento Fd e uma região determinante de complementaridade (CDR) isolada, assim como triacoros, tetracoros, anticorpos lineares, moléculas de anticorpo de cadeia única, e anticorpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticorpo. Os fragmentos Fv são a combinação das regiões variáveis das cadeias pesada e leve de imunoglobulina, e proteínas ScFv são moléculas de polipeptídeo de cadeia única recombinante em que regiões variáveis de cadeia leve e pesada de imunoglobulina são conectadas por um ligante de peptídeo. Em algumas modalidades exemplificativas, um fragmento de anticorpo contém sequência de aminoácidos suficiente do anticorpo parental do qual é um fragmento que se liga ao mesmo antígeno que o anticorpo parental; em algumas modalidades exemplificativas, um fragmento se liga ao antígeno com uma afinidade comparável àquela do anticorpo parental e/ou compete com o anticorpo parental para se ligar ao antígeno. Um fragmento de anticorpo pode ser produzido por quaisquer meios. Por exemplo, um fragmento de anticorpo pode ser enzimaticamente ou quimicamente produzido por fragmentação de um anticorpo

intacto e/ou pode ser recombinantemente produzido de um gene que codifica a sequência de anticorpo parcial. Alternativa ou adicionalmente, um fragmento de anticorpo pode ser inteira ou parcialmente produzido sinteticamente. Um fragmento de anticorpo pode compreender opcionalmente um fragmento de anticorpo de cadeia única. Alternativa ou adicionalmente, um fragmento de anticorpo pode compreender múltiplas cadeias que são ligadas, por exemplo, por ligações de dissulfeto. Um fragmento de anticorpo pode compreender opcionalmente um complexo multimolecular. Um fragmento de anticorpo funcional compreende tipicamente pelo menos cerca de 50 aminoácidos e compreende mais tipicamente pelo menos cerca de 200 aminoácidos.

[0080] A expressão "anticorpo biespecífico" inclui um anticorpo com capacidade para se ligar seletivamente a dois ou mais epítomos. Os anticorpos biespecíficos compreendem geralmente duas cadeias pesadas, com cada cadeia pesada se ligando especificamente a epítomo diferente—em duas moléculas diferentes (por exemplo, antígenos) ou na mesma molécula (por exemplo, no mesmo antígeno). Se um anticorpo biespecífico tem capacidade para ligar seletivamente dois epítomos diferentes (um primeiro epítomo e um segundo epítomo), a afinidade da primeira cadeia pesada pelo primeiro epítomo será geralmente pelo menos uma a duas ou três ou quatro ordens de magnitude mais baixa do que a afinidade da primeira cadeia pesada para o segundo epítomo, e vice-versa. Os epítomos reconhecidos pelo anticorpo biespecífico podem estar no mesmo ou em alvo diferente (por exemplo, na mesma ou em uma proteína diferente). Os anticorpos biespecíficos podem ser produzidos, por exemplo, combinando-se cadeias pesadas que reconhecem epítomos diferentes do mesmo antígeno. Por exemplo, as sequências de ácido nucleico que codificam sequências variáveis de cadeia pesada que reconhecem epítomos diferentes do mesmo antígeno podem ser fundidas a sequências de ácido

nucleico que codificam regiões constantes de cadeia pesada diferentes, e tais sequências podem ser expressas em uma célula que expressa uma cadeia leve de imunoglobulina.

[0081] Um anticorpo biespecífico típico que tem duas cadeias pesadas que têm, cada uma, três CDRs de cadeia pesada, seguido por um domínio C_{H1} , uma articulação, um domínio C_{H2} , e um domínio C_{H3} , e uma cadeia leve de imunoglobulina que não confere especificidade de ligação ao antígeno, mas pode se associar a cada cadeia pesada, ou que pode se associar a cada cadeia pesada e que pode se ligar a um ou mais dos epítomos ligados pelas regiões de ligação ao antígeno de cadeia pesada, ou que podem se associar a cada cadeia pesada e possibilitar a ligação ou uma ou ambas as cadeias pesadas a um ou ambos os epítomos. BsAbs podem ser divididas em duas classes principais, aquelas que portam uma região Fc (tipo IgG) e aquelas que não têm uma região Fc, em que a última é normalmente menor do que as moléculas biespecíficas do tipo IgG e IgG que compreendem um Fc. As bsAbs tipo IgG podem ter formatos diferentes, como, mas sem limitação triomab, IgG knobs-into-holes (kih IgG), crossMab, ort-Fab IgG, Ig de domínios variáveis duplos (DVD-Ig), Fab de dois em um ou de ação dupla (DAF), Fv de cadeia única de IgG (IgG-scFv), ou $\kappa\lambda$ -corpos. Os formatos diferentes tipo não IgG incluem scFvs em tandem, formato de diacorpo, diacorpo de cadeia única, diacorpos em tandem (TandAbs), molécula de realvejamento de afinidade dupla (DART), DART-Fc, nanocorpos ou anticorpos produzidos pelo método dock-and-lock (DNL) (Gaowei Fan, Zujian Wang & Mingju Hao, *Bispecific antibodies and their applications*, 8 JOURNAL OF HEMATOLOGY & ONCOLOGY 130; Dafne Müller & Roland E. Kontermann, *Bispecific Antibodies*, HANDBOOK OF THERAPEUTIC ANTIBODIES 265–310 (2014)).

[0082] Os métodos para produzir BsAbs não são limitados à tecnologia de quadroma com base na fusão somática de duas linhagens ce-

lulares de hibridoma diferentes, conjugação química, que envolve reticuladores químicos e abordagens genéticas com a utilização de tecnologia de DNA recombinante. Exemplos de bsAbs incluem aqueles divulgados nos seguintes pedidos de patente, os quais são incorporados a título de referência ao presente documento: N° de Sér. U.S. 12/823838, depositado em 25 de junho de 2010; N° de Sér. U.S. 13/488628, depositado em 5 de junho de 2012; N° de Sér. U.S. 14/031075, depositado em 19 de setembro de 2013; N° de Sér. U.S. 14/808171, depositado em 24 de julho de 2015; N° de Sér. U.S. 15/713574, depositado em 22 de setembro de 2017; N° de Sér. U.S. 15/713569, depositado em 22 de setembro de 2017; N° de Sér. U.S. 15/386453, depositado em 21 de dezembro de 2016; N° de Sér. U.S. 15/386443, depositado em 21 de dezembro de 2016; N° de Sér. U.S. 15/22343, depositado em 29 de julho de 2016; e N° de Sér. U.S. 15814095, depositado em 15 de novembro de 2017. Baixos níveis de impurezas de homodímero podem estar presentes em diversas etapas durante a fabricação de anticorpos biespecíficos. A detecção de tais impurezas de homodímero pode ser desafiadora quando realizada com o uso de análise de massa intacta devido a baixas abundâncias das impurezas de homodímero e a coeluição dessas impurezas com espécies principais quando executadas com o uso de um método líquido cromatográfico regular.

[0083] Conforme usado no presente documento "anticorpo multi-específico" ou "Mab" se refere a um anticorpo com especificidades de ligação para pelo menos dois antígenos diferentes. Embora tais moléculas se liguem normalmente a apenas dois antígenos (isto é, anticorpos biespecíficos, BsAbs), anticorpos com especificidades adicionais, como anticorpo triespecífico e KIH triespecífico também podem ser abordados pelo sistema e método divulgados no presente documento.

[0084] O termo "anticorpo monoclonal" conforme usado no presen-

te documento, não é limitado a anticorpos produzidos através de tecnologia de hibridoma. Um anticorpo monoclonal pode ser derivado de um clone único, incluindo qualquer clone eucariótico, procariótico ou de fago, por quaisquer meios disponíveis ou conhecidos na técnica. Os anticorpos monoclonais úteis com a presente divulgação podem ser preparados com o uso de uma ampla variedade de técnicas conhecidas na arte incluindo o uso de hibridoma, tecnologias recombinantes e de exibição de fago ou uma combinação dos mesmos.

[0085] Em algumas modalidades exemplificativas, a formulação pode compreender um agente farmacêutico ativo, em que a agente farmacêutico ativo pode ser uma molécula pequena. Conforme usado no presente documento, o termo "molécula pequena" pode se referir a compostos químicos de baixo peso molecular com peso molecular de menos do que 1500 kDa.

[0086] Em algumas modalidades exemplificativas, a formulação pode ser uma formulação de proteína.

[0087] Conforme usado no presente documento, o termo "formulação de proteína" se refere a uma proteína terapêutica que pode ser formulada junto com um ou mais veículos farmacologicamente aceitáveis. Em algumas modalidades, a proteína terapêutica pode estar presente em uma quantidade de dose unitária apropriada para administração em um regime terapêutico.

[0088] Em algumas outras modalidades, a formulação pode compreender adicionalmente excipientes incluindo, mas sem limitação, agentes tamponantes, agentes de volume, modificadores de tonicidade, tensoativos, agentes de solubilização e conservantes. Outros excipientes adicionais também podem ser selecionados com base em função e compatibilidade com as formulações podem ser encontrados, por exemplo, em Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Décima Nona Edição (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995);

Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, (Easton, Pa.: Mack Publishing Co 1975); Liberman, H. A. e Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms (Nova York, N.Y.: Marcel Decker 1980); e Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Sétima Edição (Lippincott Williams & Wilkins 1999), incorporados ao presente documento a título de referência, em sua totalidade.

[0089] Em algumas modalidades exemplificativas, a formulação pode ser estável.

[0090] A estabilidade de uma formulação pode compreender avaliar a estabilidade química, estabilidade física ou estabilidade funcional do agente farmacêutico ativo. As formulações da presente invenção exibem tipicamente altos níveis de estabilidade do agente farmacêutico ativo.

[0091] Em termos de formulações de proteína, o termo "estável", conforme usado no presente documento, se refere às proteínas nas formulações que podem reter um grau aceitável de estrutura química ou função biológica após armazenamento sob condições exemplificativas definidas no presente documento. Uma formulação pode ser estável até mesmo se a proteína contida na mesma não mantém 100% de sua estrutura química ou função biológica após armazenamento por uma quantidade definida de tempo. Sob certas circunstâncias, a manutenção de cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98% ou cerca de 99% de uma estrutura de proteína ou função após armazenamento por uma quantidade definida de tempo pode ser considerada como "estável".

[0092] Em algumas modalidades exemplificativas, a formulação pode ser usada para o tratamento, prevenção e/ou atenuação de uma doença ou distúrbio. Doenças e distúrbios não limitantes exemplificativos que podem ser tratados e/ou prevenidos pela administração das formulações farmacêuticas da presente invenção incluem, infecções;

doenças respiratórias; dor resultante de qualquer afecção associada a dor neurogênica, neuropática ou dociceptiva; distúrbio genético; distúrbio congênito; câncer; herpetiforme; urticária idiopática crônica; escleroderma, circunscrita hipertrófica; doença de Whipple; hiperplasia de próstata benigna; distúrbios pulmonares, como asma amena, moderada ou severa, reações alérgicas; doença de Kawasaki, anemia falciforme; síndrome de Churg-Strauss; doença de Grave; pré-eclâmpsia; síndrome de Sjogren; síndrome linfoproliferativa autoimune; anemia hemolítica autoimune; esôfago de Barrett; uveíte autoimune; tuberculose; nefrose; artrite, incluindo artrite reumatoide crônica; doenças intestinais inflamatórias, incluindo doença de Crohn e colite ulcerativa; lúpus eritematoso sistêmico; doenças inflamatórias; infecção por HIV; AIDS; LDL aférese; distúrbios devido a mutações de ativação de PCSK9 (ganho de mutações de função, "GOF"), distúrbios devido à Hipercolesterolemia Familiar heterozigótica (heFH); hipercolesterolemia primária; dislipidemia; doenças de fígado colestático; síndrome nefrótica; hipotireoidismo; obesidade; aterosclerose; doenças cardiovasculares; doenças neurodegenerativas; Distúrbio Inflamatório Multissistêmico de Início Neonatal (NOM ID/CINCA); Síndrome de Muckle-Wells (MWS); Síndrome Autoinflamatória Familiar Associada ao Frio (FCAS); febre mediterrânea familiar (FMF); síndrome de febre periódica associada ao receptor de fator de necrose tumoral (TRAPS); artrite idiopática juvenil de início sistêmica (Doença de Still); diabetes mellitus do tipo 1 e tipo 2; doenças autoimunes; doença do neurônio motor; doenças oculares; doenças sexualmente transmitidas; tuberculose; doença ou afecção que é atenuada, inibida ou reduzida por um antagonista de VEGF; doença ou afecção que é atenuada, inibida ou reduzida por um inibidor de PD-1; doença ou afecção que é atenuada, inibida ou reduzida por um anticorpo de interleucina; doença ou afecção que é atenuada, inibida ou reduzida por um anticorpo NGF; doença ou

afecção que é atenuada, inibida ou reduzida por um anticorpo PCSK9; doença ou afecção que é atenuada, inibida ou reduzida por um anticorpo ANGPTL; doença ou afecção que é atenuada, inibida ou reduzida por um anticorpo activina; doença ou afecção que é atenuada, inibida ou reduzida por um anticorpo GDF; doença ou afecção que é atenuada, inibida ou reduzida por um anticorpo Fel d 1; doença ou afecção que é atenuada, inibida ou reduzida por um anticorpo CD; doença ou afecção que é atenuada, inibida ou reduzida por um anticorpo C5 ou combinações dos mesmos.

[0093] Em algumas modalidades exemplificativas, a formulação pode ser administrada a um paciente. A administração pode ser por meio de qualquer rota. As rotas não limitantes de administração incluem oral, tópica ou parenteral. A administração por certas rotas parenterais pode envolver introduzir as formulações da presente invenção no corpo de um paciente através de uma agulha ou um cateter, impulsionadas por uma seringa estéril ou algum outro dispositivo mecânico, como um sistema de infusão contínua. Uma formulação fornecida pela presente invenção pode ser administrada com o uso de uma seringa, injetor, bomba ou qualquer outro dispositivo reconhecido na técnica para administração parenteral. Uma formulação da presente invenção também pode ser administrada como um aerossol para absorção no pulmão ou cavidade nasal. As formulações também podem ser administradas para absorção através das membranas mucosas, como em administração bucal.

[0094] Em algumas modalidades exemplificativas, a albumina sérica humana pode prevenir a formação de partículas de ácido graxo. Em algumas modalidades exemplificativas, a albumina sérica humana pode solubilizar partículas de ácido graxo pré-formadas. Conforme usado no presente documento, "albumina sérica humana" ou "HSA" pode incluir a proteína monomérica sintetizada no fígado. A mesma pode ser

o constituinte macromolecular primário de soro com uma concentração até 50 g/l e está em fluxo constante entre espaço intravascular e extravascular (Angelica M. Merlot, Danuta S. Kalinowski & Des R. Richardson, *Unraveling the mysteries of serum albumin* "more than just a serum protein", 5 FRONTIERS IN PHYSIOLOGY (2014)). Entre várias atividades biológicas, HSA pode transportar moléculas de baixa solubilidade, incluindo ácidos graxos, pelo corpo (Maja Thim Larsen et al., *Albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease*, 4 MOLECULAR AND CELLULAR THERAPIES (2016)). HSA pode conter nove sítios de ligação de ácido graxo distintos, três sítios de alta afinidade, um de média afinidade e cinco de baixa afinidade (Eileen S. Krenzel, Zhongjing Chen & James A. Hamilton, *Correction to Correspondence of Fatty Acid and Drug Binding Sites on Human Serum Albumin: A Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Study*, 52 BIOCHEMISTRY 2382–2382 (2013)).

[0095] Em algumas modalidades exemplificativas, a formulação pode compreender adicionalmente polissorbato.

[0096] Conforme usado no presente documento, "polissorbato" se refere a um excipiente comum usado em desenvolvimento de formulação para proteger anticorpos contra vários estresses físicos, como agitação, processos de congelamento-descongelamento, e interfaces de ar/água (Emily Ha, Wei Wang & Y. John Wang, *Peroxide formation in polysorbate 80 and protein stability*, 91 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 2252–2264 (2002); Bruce A. Kerwin, *Polysorbates 20 and 80 Used in the Formulation of Protein Biotherapeutics: Structure and Degradation Pathways*, 97 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 2924–2935 (2008); Hanns-Christian Mahler et al., *Adsorption Behavior of a Surfactant and a Monoclonal Antibody to Sterilizing-Grade Filters*, 99 Journal of Pharmaceutical Sciences 2620–2627 (2010)). O polissorbato pode incluir um tensoativo anfipático não iônico composto de este-

res de ácido graxo de polioxietileno-sorbitano, como grupo de cabeça polioxietileno sorbitano e uma cadeia lateral de monolaurato saturada (polissorbato 20; PS20) ou uma cadeia lateral de mono-oleato insaturada (polissorbato 80; PS80). Em algumas modalidades exemplificativas, o polissorbato pode estar presente na formulação na faixa de 0,001% a 1% (peso/volume). Polissorbato também pode conter uma mistura de várias cadeias de ácido graxo; por exemplo, polissorbato 80 contém ácidos graxos oleico, palmítico, mirístico e esteárico, com a fração de mono-oleato compondo aproximadamente 58% da mistura polidispersa (Nitin Dixit et al., *Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20 Degradation in a Sulfatase Drug Product Leading to Free Fatty Acid Particles*, 105 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1657–1666 (2016)). Exemplos não limitantes de polissorbatos incluem polissorbato-20, polissorbato-40, polissorbato-60, polissorbato-65 e polissorbato-80.

[0097] Um polissorbato pode ser suscetível à auto-oxidação de maneira dependente de pH e temperatura, e adicionalmente, a exposição à luz UV também pode produzir instabilidade (Ravuri S.k. Kishore et al., *Degradation of Polysorbates 20 and 80: Studies on Thermal Autoxidation and Hydrolysis*, 100 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 721–731 (2011)), resultando em ácidos graxos livres em solução juntamente com o grupo cabeça de sorbitano. Os ácidos graxos livres resultantes de polissorbato podem incluir quaisquer ácidos graxos alifáticos com seis a vinte carbonos. Exemplos não limitantes de ácidos graxos livres incluem ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico ou combinações dos mesmos.

[0098] Em algumas modalidades exemplificativas, as partículas de ácido graxo podem ter pelo menos 5 µm em tamanho. Adicionalmente, essas partículas de ácido graxo podem ser classificadas de acordo com seu tamanho como visível (> 100 µm), subvisível (< 100 µm, que

pode ser subdividido em microns (1-100 µm) e submicrons (100 nm-1000 nm)) e partículas nanométricas (< 100 nm) (Linda Narhi, Jeremy Schmit & Deepak Sharma, *Classification of protein aggregates*, 101 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 493–498).

[0099] Em algumas modalidades exemplificativas, as partículas de ácido graxo podem ser partículas visíveis. Partículas visíveis podem ser determinadas por inspeção visual.

[00100] Em algumas modalidades exemplificativas, as partículas de ácido graxo podem ser partículas subvisíveis. Partículas subvisíveis podem ser monitoradas pelo método de bloqueio leve de acordo com a Farmacopeia dos Estados Unidos (USP).

[00101] Em algumas modalidades exemplificativas, as partículas de ácido graxo podem ser formadas de polissorbatos. Em algumas modalidades exemplificativas específicas, as partículas de ácido graxo podem ser formadas de polissorbatos na presença de uma enzima lipase. Conforme usado no presente documento, "lipase" se refere a uma enzima que pode catalisar a hidrólise de gorduras. As lipases podem ser encontradas essencialmente em todas as formas de vida, de animais a plantas a micróbios. A superfamília de lipase de mamífero pode ser compreendida de 7 classes diferentes, diferenciadas pela localização e especificidade de substrato. A análise de mRNA de CHO-K1 encontrou 137 lipases e fosfolipases, incluindo variantes (Benjamin G. Kremkow et al., *CHOgenome.org 2,0: Genome resources and website updates*, 10 BIOTECHNOLOGY JOURNAL 931–938 (2015)). Uma lipase especificamente responsável por degradação de polissorbato em produtos de fármaco bioterapêuticos purificados não foi identificada e é provável que diversas sejam encontradas, sugerindo uma influência do processo de fabricação e da bioterapêutica em si. Diversas lipases diferentes podem ser triadas de origens de mamífero, fúngicas e bacterianas disponíveis de fontes comerciais.

[00102] Em algumas modalidades exemplificativas, as partículas de ácido graxo podem ser detectadas por Espectroscopia de Raman. Conforme usado no presente documento, o termo "espectroscopia de Raman" se refere a um método espectroscópico com base em método de dispersão de Raman. A Espectroscopia de Raman pode fornecer um espectro de Raman, o qual pode identificar a presença e a posição de bandas na região de digital (2000 a 400 cm^{-1}) que possibilita a identificação química do material analisado por comparação com um banco de dados de espectros de Raman (C. V. Raman & K. S. Krishnan, *A New Type of Secondary Radiation*, 121 NATURE 501–502 (1928); Zai-Qing Wen, *Raman spectroscopy of protein pharmaceuticals*, 96 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 2861–2878 (2007)).

Modalidades exemplificativas

[00103] As modalidades divulgadas no presente documento fornecem composições, métodos e sistemas para a caracterização rápida de proteínas em uma amostra.

[00104] Conforme usado no presente documento, os termos "incluir", "inclui" e "incluindo" são destinados a serem não limitantes e são entendidos como "compreender", "compreende" e "que compreende", respectivamente.

[00105] Em algumas modalidades exemplificativas, a divulgação fornece um método para prevenir ou reduzir a formação de partículas de ácido graxo em uma formulação que compreende adicionar à formulação uma quantidade eficaz da albumina sérica humana.

[00106] Em algumas modalidades exemplificativas, a divulgação fornece um método para solubilizar partículas de ácido graxo em uma formulação que compreende adicionar à formulação uma quantidade eficaz da albumina sérica humana.

[00107] Em algumas modalidades exemplificativas, a divulgação fornece uma formulação que compreende (i) um agente farmacêutico

ativo e (ii) albumina sérica humana.

[00108] Em algumas modalidades exemplificativas específicas, o ingrediente farmacêutico ativo pode ser uma molécula pequena. Em algumas outras modalidades exemplificativas específicas, o ingrediente farmacêutico ativo pode ser uma proteína. Em algumas modalidades exemplificativas, o ingrediente farmacêutico ativo pode ser uma proteína terapêutica.

[00109] Em algumas modalidades exemplificativas, a formulação pode compreender um anticorpo. Em algumas modalidades exemplificativas específicas, a formulação pode compreender um anticorpo selecionado de um grupo que consiste em anticorpo monoclonal, anticorpo policlonal, fragmentos de anticorpo, anticorpo biespecífico, anticorpo multiespecífico ou combinações dos mesmos.

[00110] Em algumas modalidades exemplificativas, a formulação pode compreender pelo menos um agente farmacêutico ativo. Em algumas modalidades exemplificativas específicas, a formulação pode compreender dois agentes farmacêuticos ativos.

[00111] Em algumas modalidades exemplificativas, a formulação pode ser usada para tratamento de uma doença ou um distúrbio.

[00112] Em algumas modalidades exemplificativas, a formulação pode ser usada para prevenção de uma doença ou um distúrbio.

[00113] Em algumas modalidades exemplificativas, a formulação pode ser administrada a um paciente.

[00114] Em algumas modalidades exemplificativas específicas, a formulação pode ser administrada a um paciente oralmente.

[00115] Em algumas modalidades exemplificativas, a formulação pode ser administrada a um paciente por meio de uma rota parenteral. Em algumas modalidades específicas, a formulação pode ser administrada a um paciente por meio de uma rota intravenosa. Em algumas modalidades específicas, a formulação pode ser administrada a um

paciente por meio de uma rota subcutânea. Em algumas modalidades específicas, a formulação pode ser administrada a um paciente por meio de uma rota intramuscular.

[00116] Em algumas modalidades exemplificativas, a formulação pode ser uma formulação líquida. Em algumas modalidades exemplificativas, a quantidade de agente farmacêutico ativo na formulação pode estar na faixa de cerca de 0,01 mg/ml a cerca de 600 mg/ml. Em algumas modalidades específicas, a quantidade de agente farmacêutico ativo na formulação pode ser cerca de 0,01 mg/ml, cerca de 0,02 mg/ml, cerca de 0,03 mg/ml, cerca de 0,04 mg/ml, cerca de 0,05 mg/ml, cerca de 0,06 mg/ml, cerca de 0,07 mg/ml, cerca de 0,08 mg/ml, cerca de 0,09 mg/ml, cerca de 0,1 mg/ml, cerca de 0,2 mg/ml, cerca de 0,3 mg/ml, cerca de 0,4 mg/ml, cerca de 0,5 mg/ml, cerca de 0,6 mg/ml, cerca de 0,7 mg/ml, cerca de 0,8 mg/ml, cerca de 0,9 mg/ml, cerca de 1 mg/ml, cerca de 2 mg/ml, cerca de 3 mg/ml, cerca de 4 mg/ml, cerca de 5 mg/ml, cerca de 6 mg/ml, cerca de 7 mg/ml, cerca de 8 mg/ml, cerca de 9 mg/ml, cerca de 10 mg/ml, cerca de 15 mg/ml, cerca de 20 mg/ml, cerca de 25 mg/ml, cerca de 30 mg/ml, cerca de 35 mg/ml, cerca de 40 mg/ml, cerca de 45 mg/ml, cerca de 50 mg/ml, cerca de 55 mg/ml, cerca de 60 mg/ml, cerca de 65 mg/ml, cerca de 70 mg/ml, cerca de 80 mg/ml, cerca de 85 mg/ml, cerca de 90 mg/ml, cerca de 100 mg/ml, cerca de 110 mg/ml, cerca de 120 mg/ml, cerca de 130 mg/ml, cerca de 140 mg/ml, cerca de 150 mg/ml, cerca de 160 mg/ml, cerca de 170 mg/ml, cerca de 180 mg/ml, cerca de 190 mg/ml, cerca de 200 mg/ml, cerca de 225 mg/ml, cerca de 250 mg/ml, cerca de 275 mg/ml, cerca de 300 mg/ml, cerca de 325 mg/ml, cerca de 350 mg/ml, cerca de 375 mg/ml, cerca de 400 mg/ml, cerca de 425 mg/ml, cerca de 450 mg/ml, cerca de 475 mg/ml, cerca de 500 mg/ml, cerca de 525 mg/ml, cerca de 550 mg/ml, cerca de 575 mg/ml ou cerca de 600 mg/ml.

[00117] Em algumas modalidades exemplificativas, a formulação pode ter a capacidade para formar partículas de ácido graxo. Em algumas modalidades exemplificativas específicas, as partículas de ácido graxo podem compreender ácidos graxos livres. Em algumas outras modalidades exemplificativas específicas, uma razão de moléculas entre ácidos graxos livres e moléculas da albumina sérica humana é cerca de 6:1 a cerca de 1:1. Em algumas modalidades exemplificativas específicas, a razão entre moléculas de ácidos graxos livres e moléculas da albumina sérica humana é cerca de 0,5:1, cerca de 0,6:1, cerca de 0,7:1, cerca de 0,8:2, cerca de 0,9:1, cerca de 1:1, cerca de 2:1, cerca de 2:1, cerca de 4:1, cerca de 5:1, cerca de 6:1, cerca de 7:1, cerca de 8:1, cerca de 9:1 ou cerca de 10:1. Em algumas modalidades exemplificativas específicas, as partículas de ácido graxo podem compreender ácido oleico.

[00118] Em algumas modalidades exemplificativas específicas, as partículas de ácido graxo podem compreender ácidos alifáticos de cadeia linear saturada. Em algumas outras modalidades exemplificativas específicas, as partículas de ácido graxo podem compreender ácidos alifáticos de cadeia linear saturada com no máximo vinte átomos de carbono. Em algumas outras modalidades exemplificativas específicas, o ácido graxo livre pode incluir de pelo menos um ácido graxo selecionado de ácido etanoico, ácido propanoico, ácido butanoico, ácido pentanoico, ácido hexanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico, ácido undecanoico, ácido dodecanoico, ácido tridecanoico, ácido tetradecanoico, ácido pentadecanoico, ácido hexadecanoico, ácido heptadecanoico, ácido octadecanoico, ácido nonadecanoico, ácido eicosanoico ou combinações dos mesmos.

[00119] Em algumas modalidades exemplificativas específicas, as partículas de ácido graxo podem compreender ácidos alifáticos de cadeia linear insaturados. Em algumas modalidades exemplificativas es-

pecíficas, as partículas de ácido graxo podem compreender ácidos alifáticos de cadeia linear insaturados com no máximo vinte átomos de carbono. Em algumas modalidades exemplificativas, as partículas de ácido graxo livres podem incluir ácido estearidônico, ácido linolelaídico, ácido palmitoleico, ácido vacênico, ácido paulínico, ácido eládico, ácido gondoico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido eicosanoico, ácido palmitoleico, ácido linoleico, ácido araquidônico e combinações dos mesmos.

[00120] Em algumas modalidades exemplificativas, a concentração da albumina sérica humana na formulação pode ser pelo menos cerca de 2,5 mg/ml. Em algumas modalidades exemplificativas específicas, a concentração da albumina sérica humana na formulação pode ser pelo menos cerca de 2,5 mg/ml, pelo menos cerca de 2,6 mg/ml, pelo menos cerca de 2,7 mg/ml, pelo menos cerca de 2,8 mg/ml, pelo menos cerca de 2,9 mg/ml, pelo menos cerca de 3,0 mg/ml, pelo menos cerca de 3,1 mg/ml, pelo menos cerca de 3,2 mg/ml, pelo menos cerca de 3,3 mg/ml, pelo menos cerca de 3,4 mg/ml, pelo menos cerca de 3,5 mg/ml, 3,6 mg/ml, pelo menos cerca de 3,7 mg/ml, pelo menos cerca de 3,8 mg/ml, pelo menos cerca de 3,9 mg/ml, pelo menos cerca de 4,0 mg/ml, pelo menos cerca de 4,1 mg/ml, pelo menos cerca de 4,2 mg/ml, pelo menos cerca de 4,3 mg/ml, pelo menos cerca de 4,4 mg/ml, pelo menos cerca de 4,5 mg/ml, 4,6 mg/ml, pelo menos cerca de 4,7 mg/ml, pelo menos cerca de 4,8 mg/ml, pelo menos cerca de 4,9 mg/ml, pelo menos cerca de 5,0 mg/ml, pelo menos cerca de 5,1 mg/ml, pelo menos cerca de 5,2 mg/ml, pelo menos cerca de 5,3 mg/ml, pelo menos cerca de 5,4 mg/ml, pelo menos cerca de 5,5 mg/ml, 5,6 mg/ml, pelo menos cerca de 5,7 mg/ml, pelo menos cerca de 5,8 mg/ml, pelo menos cerca de 5,9 mg/ml, pelo menos cerca de 6,0 mg/ml, pelo menos cerca de 6,1 mg/ml, pelo menos cerca de 6,2 mg/ml, pelo menos cerca de 6,3 mg/ml, pelo menos cerca de 6,4

mg/ml, pelo menos cerca de 6,5 mg/ml, 6,6 mg/ml, pelo menos cerca de 6,7 mg/ml, pelo menos cerca de 6,8 mg/ml, pelo menos cerca de 6,9 mg/ml, pelo menos cerca de 7,0 mg/ml, pelo menos cerca de 7,1 mg/ml, pelo menos cerca de 7,2 mg/ml, pelo menos cerca de 7,3 mg/ml, pelo menos cerca de 7,4 mg/ml ou pelo menos cerca de 7,5 mg/ml.

[00121] Em algumas modalidades exemplificativas, a albumina sérica humana na formulação pode reduzir a formação de partículas de ácido graxo em uma formulação.

[00122] Em algumas modalidades exemplificativas, a albumina sérica humana na formulação pode solubilizar partículas de ácido graxo em uma formulação.

[00123] Em algumas modalidades exemplificativas, a albumina sérica humana na formulação pode ligar ácidos graxos livres gerados por degradação de polissorbato e sequestrar os mesmos, reduzindo a concentração eficaz em solução a níveis abaixo da concentração micelar crítica.

[00124] Em algumas modalidades exemplificativas, a albumina sérica humana na formulação pode servir como um coletor de ácido graxo.

[00125] Em algumas modalidades exemplificativas, a albumina sérica humana na formulação pode eliminar a aparência de partículas de ácido graxo visíveis/subvisíveis.

[00126] Em algumas modalidades exemplificativas, a albumina sérica humana na formulação pode estender a vida em prateleira da formulação em relação à formulação sem albumina sérica humana.

[00127] Em algumas modalidades exemplificativas, a formulação pode compreender adicionalmente polissorbato. Em algumas modalidades específicas, o polissorbato pode ser selecionado de polissorbato 20, polissorbato 40, polissorbato 60, polissorbato 65, polissorbato 80 e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades exemplificati-

vas, a concentração de polissorbato na formulação pode ser cerca de 0,001% em p/v a cerca de 1% em p/v. Em algumas modalidades específicas, a concentração de polissorbato na formulação pode ser cerca de 0,001% em p/v, cerca de 0,002 % em p/v, cerca de 0,003 % em p/v, cerca de 0,004 % em p/v, cerca de 0,005 % em p/v, cerca de 0,006 % em p/v, cerca de 0,007 % em p/v, cerca de 0,008 % em p/v, cerca de 0,009 % em p/v, cerca de 0,01% em p/v, cerca de 0,011% em p/v, cerca de 0,012 % em p/v, cerca de 0,013 % em p/v, cerca de 0,014 % em p/v, cerca de 0,015 % em p/v, cerca de 0,016 % em p/v, cerca de 0,017 % em p/v, cerca de 0,018 % em p/v, cerca de 0,019 % em p/v, cerca de 0,02 % em p/v, cerca de 0,021% em p/v, cerca de 0,022 % em p/v, cerca de 0,023 % em p/v, cerca de 0,024 % em p/v, cerca de 0,025 % em p/v, cerca de 0,026 % em p/v, cerca de 0,027 % em p/v, cerca de 0,028 % em p/v, cerca de 0,029 % em p/v, cerca de 0,03 % em p/v, cerca de 0,031% em p/v, cerca de 0,031% em p/v, cerca de 0,032 % em p/v, cerca de 0,033 % em p/v, cerca de 0,034 % em p/v, cerca de 0,035 % em p/v, cerca de 0,036 % em p/v, cerca de 0,037 % em p/v, cerca de 0,038 % em p/v, cerca de 0,039 % em p/v, cerca de 0,04 % em p/v, cerca de 0,041% em p/v, cerca de 0,042 % em p/v, cerca de 0,043 % em p/v, cerca de 0,044 % em p/v, cerca de 0,045 % em p/v, cerca de 0,046 % em p/v, cerca de 0,047 % em p/v, cerca de 0,048 % em p/v, cerca de 0,049 % em p/v, cerca de 0,05 % em p/v, cerca de 0,051% em p/v, cerca de 0,052 % em p/v, cerca de 0,053 % em p/v, cerca de 0,054 % em p/v, cerca de 0,055 % em p/v, cerca de 0,056 % em p/v, cerca de 0,057 % em p/v, cerca de 0,058 % em p/v, cerca de 0,059 % em p/v, cerca de 0,06 % em p/v, cerca de 0,061% em p/v, cerca de 0,062 % em p/v, cerca de 0,063 % em p/v, cerca de 0,064 % em p/v, cerca de 0,065 % em p/v, cerca de 0,066 % em p/v, cerca de 0,067 % em p/v, cerca de 0,068 % em p/v, cerca de 0,069 % em p/v, cerca de 0,07 % em p/v, cerca de 0,071% em p/v,

cerca de 0,072 % em p/v, cerca de 0,073 % em p/v, cerca de 0,074 % em p/v, cerca de 0,075 % em p/v, cerca de 0,076 % em p/v, cerca de 0,077 % em p/v, cerca de 0,078 % em p/v, cerca de 0,079 % em p/v, cerca de 0,08 % em p/v, cerca de 0,081% em p/v, cerca de 0,082 % em p/v, cerca de 0,083 % em p/v, cerca de 0,084 % em p/v, cerca de 0,085 % em p/v, cerca de 0,086 % em p/v, cerca de 0,087 % em p/v, cerca de 0,088 % em p/v, cerca de 0,089 % em p/v, cerca de 0,09 % em p/v, cerca de 0,091% em p/v, cerca de 0,092 % em p/v, cerca de 0,093 % em p/v, cerca de 0,094 % em p/v, cerca de 0,095 % em p/v, cerca de 0,096 % em p/v, cerca de 0,097 % em p/v, cerca de 0,098 % em p/v, cerca de 0,099 % em p/v, cerca de 0,1% em p/v, cerca de 0,11% em p/v, cerca de 0,12 % em p/v, cerca de 0,13 % em p/v, cerca de 0,14 % em p/v, cerca de 0,15 % em p/v, cerca de 0,16 % em p/v, cerca de 0,17 % em p/v, cerca de 0,18 % em p/v, cerca de 0,19 % em p/v, cerca de 0,2 % em p/v, cerca de 0,21% em p/v, cerca de 0,22 % em p/v, cerca de 0,23 % em p/v, cerca de 0,24 % em p/v, cerca de 0,25 % em p/v, cerca de 0,26 % em p/v, cerca de 0,27 % em p/v, cerca de 0,28 % em p/v, cerca de 0,29 % em p/v, cerca de 0,3 % em p/v, cerca de 0,31% em p/v, cerca de 0. 4 % em p/v, cerca de 0,41% em p/v, cerca de 0,42 % em p/v, cerca de 0,43 % em p/v, cerca de 0,44 % em p/v, cerca de 0,45 % em p/v, cerca de 0,46 % em p/v, cerca de 0,47 % em p/v, cerca de 0,48 % em p/v, cerca de 0,49 % em p/v, cerca de 0,5 % em p/v, cerca de 0,51% em p/v, cerca de 0,52 % em p/v, cerca de 0,53 % em p/v, cerca de 0,54 % em p/v, cerca de 0,55 % em p/v, cerca de 0,56 % em p/v, cerca de 0,57 % em p/v, cerca de 0,58 % em p/v, cerca de 0,59 % em p/v, cerca de 0,6 % em p/v, cerca de 0,61% em p/v, cerca de 0,62 % em p/v, cerca de 0,63 % em p/v, cerca de 0,64 % em p/v, cerca de 0,65 % em p/v, cerca de 0,66 % em p/v, cerca de 0,67 % em p/v, cerca de 0,68 % em p/v, cerca de 0,69 % em p/v, cerca de 0,7 % em p/v, cerca de 0,71% em p/v, cerca de 0,72 % em

p/v, cerca de 0,73 % em p/v, cerca de 0,74 % em p/v, cerca de 0,75 % em p/v, cerca de 0,76 % em p/v, cerca de 0,77 % em p/v, cerca de 0,78 % em p/v, cerca de 0,79 % em p/v, cerca de 0,8 % em p/v, cerca de 0,81% em p/v, cerca de 0,82 % em p/v, cerca de 0,83 % em p/v, cerca de 0,84 % em p/v, cerca de 0,85 % em p/v, cerca de 0,86 % em p/v, cerca de 0,87 % em p/v, cerca de 0,88 % em p/v, cerca de 0,89 % em p/v, cerca de 0,9 % em p/v, cerca de 0,91% em p/v, cerca de 0,92 % em p/v, cerca de 0,93 % em p/v, cerca de 0,94 % em p/v, cerca de 0,95 % em p/v, cerca de 0,96 % em p/v, cerca de 0,97 % em p/v, cerca de 0,98 % em p/v, cerca de 0,99 % em p/v ou cerca de 1% em p/v.

[00128] Em algumas modalidades exemplificativas, a formulação pode compreender adicionalmente uma enzima lipase.

[00129] Em algumas modalidades exemplificativas, a formulação pode compreender adicionalmente um polissorbato, e uma enzima lipase, em que a enzima lipase pode hidrolisar o polissorbato para formar partículas de ácido graxo.

[00130] Várias publicações, incluindo patentes, pedidos de patente, pedidos de patente publicados, números de acesso, artigos técnicos e artigos acadêmicos são citados ao longo do relatório descritivo. Cada uma dessas referências citadas é incorporada a título de referência, em sua totalidade e com todos os propósitos, no presente documento.

[00131] A presente invenção será mais completamente entendida a título de referência para os seguintes Exemplos. Os mesmos não devem, entretanto, ser interpretados como limitantes do escopo da invenção

EXEMPLOS

[00132] **Materiais e preparação de reagente.** Todas as reações foram executadas em uma solução tamponada aquosa que contém Tris 25 mM, pH 7,5, KCl 100 mM, CaCl₂ 20 mM (tampão TKC) a menos que indicado de outro modo. A lipase de *Chromobacterium viscosum*

foi adquirida de EMD Millipore (Billerica, MA); Albumina Sérica Humana livre de ácido graxo liofilizado (FAF-HSA) e soro humano foram adquiridos a partir de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). O polissorbato 20 super-refinado (PS20) e polissorbato 80 (PS80) foram obtidos de Croda (Edison, NJ). Para experimentos com IgG, IgG policlonal liofilizada humana adquirida de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) foi reconstituída de acordo com a recomendação do fabricante com NaCl 150 mM e Tris 35 mM pH 8,0 e dessalinizada em uma coluna de dessalinização de centrífuga Zeba (Thermo Fisher Scientific) equilibrada com Tris 25 mM, KCl 100 mM, pH 7,5.

[00133] **Purificação de reagentes.** A lipase de *C. viscosum* liofilizada foi reconstituída em aproximadamente 1 ml de tampão de reação de TKC e purificada com uma coluna Superdex Increase 200 10/300 SEC equilibrada no mesmo tampão. As frações de lipase purificadas foram agrupadas e a concentração de proteína (4,2 mg/ml) foi determinada com um espectrofotômetro Nanodrop One C em $UV_{\lambda=280\text{ nm}}$ com o uso de um coeficiente de extinção de 0,95. As alíquotas foram armazenadas em glicerol 10% (em v/v) em -20 °C. A concentração de FAF-HSA foi determinada com um Nanodrop OneC em $UV_{\lambda=280\text{ nm}}$ com o uso de um coeficiente de extinção de 0,531.

[00134] **Detecção de partícula por medição de turbidez.** Um ensaio com base em placa foi usado para detectar a presença de partículas monitorando-se a absorbância em 450 nm ao longo do tempo, tipicamente 2-4 horas. O ensaio detecta partículas maiores do que aproximadamente 20 nm, com base em princípios fundamentais de dispersão de luz (avaliação de turbidez). A lipase purificada foi adicionada ao tampão TKC que contém polissorbato 80 0,1% em concentração final na faixa de 0,4 a 5 µg/ml. A absorbância foi medida em intervalos de 5 minutos com agitação intermitente em um leitor de placa Spectra Max 340 mantido a 25 °C. Os valores de linha de base foram estabelecidos

medindo-se a absorvância de polissorvato 80 0,1% sem a adiçãõ de lipase. O controle de instrumento, a aquisição de dados e a análise foram realizados com o uso de software SoftMax Pro (versãõ 6.5).

[00135] Diversas lipases diferentes de origens de mamíferos, fúngicas e bacterianas de fontes comerciais foram triadas. A seleção da lipase bacteriana teve base grandemente na hidrólise de polissorvato rápida e formação de partícula subsequente, que oferece uma vantagem distinta para identificar condições para controlar formação de partícula, que pode levar de meses a anos em uma definição de produto de fármaco bioterapêutico. Adicionalmente, a lipase bacteriana foi amenizável a uma ampla gama de condições de solução, que influencia fortemente a formação de partículas. Em particular, a presença de potássio para auxiliar na neutralização da repulsão eletroestática dos grupos de cabeça ácidos, é essencial.

EXEMPLO 1. HIDRÓLISE DE POLISSORBATO 80 POR LIPASE DE *CHROMOBACTERIUM VISCOSUM* EM FORMAÇÃO DE PARTÍCULA.

[00136] A formação de partículas em soluções que contêm PS80 pode ocorrer devido à hidrólise por lipases (Nitin Dixit et al., *Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20 Degradation in a Sulfatase Drug Product Leading to Free Fatty Acid Particles*, 105 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1657–1666 (2016)).

[00137] A formação de partícula é um processo de múltiplas etapas: primeiro, a lipase catalisa a hidrólise de PS80 no éster de ácido graxo para liberar um anel de sorbitano e a cadeia de ácido graxo; segundos ácidos graxos livres múltiplos se agregam para formar partículas. A fim de testar a atividade de lipase de *Chromobacterium viscosum*, PS80 0,1% foi incubado com várias concentrações de lipase entre 0,4 a 5 µg/ml e a absorvância em 450 nm foi monitorada por diversas horas.

[00138] A fim de detectar a presença de partículas em solução, a

turbidez de amostra foi monitorada com espectroscopia de absorvância. As amostras foram incubadas a 25 °C e a absorvância em 450 nm foi assumida ao longo do curso de 120 minutos. A concentração diferente de lipase entre 0 e 1 µg foi usada. A amostra que não continha lipase foi usada como controle.

[00139] Um aumento em sinal em 450 nm é indicativo de um aumento em turbidez de solução, que é atribuído à formação de partícula. A Figura 1 mostra que aumentar a concentração de lipase resultou tanto em uma turbidez final elevada quanto em uma diminuição no tempo necessário para observar o aumento inicial em uma resposta dependente de dose. Adicionalmente, a amostra que não contém lipase foi usada como controle (triângulos abertos), não aumentou em turbidez ao longo do tempo e forneceu um nível de absorvância de linha de base.

EXEMPLO 2. IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSIÇÃO DE PARTÍCULAS FORMADAS

2.1 Preparação de partículas.

[00140] As partículas foram preparadas incubando-se lipase 2,5 µg/ml com PS80 em tampão TKC à temperatura ambiente por 3 horas, seguido por centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o pélete foi lavado com tampão uma vez e reconstituído por sonicação. Para geração de partícula na presença de IgG, IgG policlonal humana foi adicionada a uma concentração final de 7,5 mg/ml. Os péletes mecanicamente dispersos foram depositados em filtros de membrana de policarbonato de 5 µm (RapID; Monmouth Junction, NJ). A espectroscopia de Raman foi realizada na partícula com o uso de um RapID Single Particle Explorer com um laser monocromático de 785 nm em 100% de intensidade/10 segundos de tempo de exposição no objetivo 50x para gerar espectros específicos para a amostra.

2.2 ESPECTROSCOPIA DE RAMAN.

[00141] A espectroscopia de Raman foi empregada para identificar constituintes de partícula após a incubação de lipase com PS80. Esse método usa dispersão de luz inelástica para gerar um espectro de energia único para cada molécula, que é, então, comparado com uma biblioteca de referência que contém as digitais de várias estruturas químicas. Os espectros de Raman de 156 dentre 200 partículas foram identificados como altamente similares ao espectro de ácido oleico (Figura 2). O traço preto conforme visto na Figura 2 é o ácido oleico de referência interno. O pico em 1650 cm^{-1} é diretamente proporcional ao número de ligações C=C em uma cadeia de hidrocarboneto linear e, desse modo, é uma assinatura da cadeia de hidrocarboneto de ácido oleico insaturada. Outras espécies identificadas incluíram ácido láurico e ácido palmítico, ambos os quais também são produtos de degradação de polissorbato.

EXEMPLO 3. PREVENÇÃO DE FORMAÇÃO DE PARTÍCULA POR HSA.

[00142] HSA contém diversos sítios de alta e baixa afinidade para ácidos graxos e, portanto, têm o potencial para atuar como um coletor de ácido graxo, que pode inibir a formação de partícula mediante hidrólise de polissorbato. Para testar a eficácia de HSA na prevenção de formação de partícula, PS80 0,1% foi incubado com $0,5\ \mu\text{g}$ de lipase na presença de concentrações crescentes de FAF-HSA a $25\ ^\circ\text{C}$ e a turbidez de solução foi monitorada medindo-se a absorvância a 450 nm por seis horas.

[00143] A Figura 3 mostra os gráficos de absorvância em 450 nm como uma função de tempo para várias concentrações de FAF-HSA. A amostra sem FAF-HSA (losangos abertos) fornece o limite superior para absorvância ($\sim 0,4\text{ nm}$). Conforme visto na Figura 3, o efeito de HSA na aparência de partículas foi uma resposta dependente de dose em que as barras de erro representam erro padrão de duas replicatas.

A amostra de controle não continha FAF-HSA e mostrou a absorbância final de aproximadamente 0,4 OD após 6 horas. A adição de FAF-HSA resultou tanto em uma diminuição na absorbância final (turbidez mais baixa) quanto em um atraso temporal no início de turbidez de maneira dependente de concentração. Notavelmente, as amostras que contêm FAF-HSA 7,5 mg/ml não mostram qualquer absorbância observável ao longo desse período de tempo. Os resultados similares foram obtidos com PS20 em vez de PS80 (dados não mostrados).

EXEMPLO 4. A SATURAÇÃO PARCIAL DE SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE ÁCIDO GRAXO PREVINE HSA DE MITIGAR A FORMAÇÃO DE PARTÍCULA.

[00144] Para definir adicionalmente o mecanismo molecular pelo qual HSA inibe a formação de partícula, a medição de mudanças de turbidez em soluções que contêm HSA que foram pré-incubadas com ácido esteárico em razão estequiométrica com os três sítios de ligação de alta afinidade, foi executada. Embora ácido oleico seja uma comparação mais direta, a solubilidade do ácido graxo monoinsaturado tornou difícil minimizar a transferência de ácido graxo livre para as amostras; portanto, ácido esteárico, uma molécula saturada com um número equivalente de hidrocarbonetos, foi escolhida como um substituto comparável.

[00145] HSA carregada com ácido esteárico (SA-HSA) foi preparada adicionando-se ácido esteárico puro 70 mM (Sigma) em etanol a FAF-HSA em uma razão molar 3:1, incubando à temperatura ambiente por 30-60 minutos a 25 °C, então, centrifugando a 22000 rcf por 4 minutos para peletizar o ácido esteárico não ligado, seguida por adição de 0,5 mg de lipase e PS80 0,1%, e a absorbância em 450 nm foi monitorada por seis horas.

[00146] O gráfico na Figura 4 representa a absorbância em 450 nm como uma função de tempo por várias concentrações de SA-HSA e a

amostra sem SA-HSA (círculos abertos) fornece o limite superior para absorvância ($\sim 0,5$) enquanto as barras de erro representam o erro padrão de três replicatas.

[00147] Enquanto FAF-HSA exibiu uma diminuição dependente de dose em turbidez com inibição completa em 7,5 mg/ml, um aumento em turbidez foi detectado em todas as amostras que contêm SA-HSA, indicando que a formação de partícula não foi inibida (Figura 4). Além disso, o tempo necessário para o início de turbidez foi mais curto em comparação com amostras que contêm quantidades equivalentes de FAF-HSA (Figura 3).

EXEMPLO 5. MITIGAÇÃO DE FORMAÇÃO DE PARTÍCULA EM UMA PREPARAÇÃO DE ANTICORPO SEM HSA

[00148] A mitigação de formação de partícula pareceu ser diretamente proporcional à concentração de HSA adicionada à mistura de polissorbato/lipase; entretanto, a possibilidade de que qualquer proteína pode prevenir não especificamente a formação de partícula permaneceu. A fim de determinar se esse efeito é específico para HSA ou pode ser uma propriedade geral de quaisquer espécies de proteína, a IgG policlonal humana, a segunda proteína sérica circulante mais abundante (N. Leigh Anderson & Norman G. Anderson, *The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects*, 1 MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS 845-867 (2002) foi substituída por HSA e as soluções foram monitoradas quanto à turbidez ao longo do tempo.

[00149] Para experimentos com IgG, IgG policlonal humana adquirida de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) foi reconstituída de acordo com a recomendação do fabricante com NaCl 150 mM e Tris 35 mM pH 8,0 e dessalinizada em uma coluna de dessalinização de centrífuga Zeba (Thermo Fisher Scientific) equilibrada com Tris 25 mM, KCl 100 mM e pH 7,5.

[00150] Para testar a especificidade de mitigação de partícula de ácido graxo para HSA, concentrações diferentes de IgG policlonal humana foram adicionadas à solução que contém 0,5 µg de lipase e PS80 0,1% a 25 °C e absorbância a 450 nm foi monitorada por seis horas.

[00151] Uma amostra de controle positivo com lipase e PS80, mas sem IgG (Figura 5, losangos abertos) foi usada para fornecer um limite superior para absorbância (~0,5). Uma amostra com PS80 e IgG 10 mg/ml, mas sem lipase (triângulos vermelhos) foi usada para fornecer um controle negativo que mostra absorbância de linha de base em 450 nm.

[00152] Em contraste com a diminuição em turbidez observada para amostras que contêm FAF-HSA, todas as amostras que contêm poli-IgG mostraram rapidamente um aumento em absorbância, indicando que a mesma não previne a formação de partícula (Figura 5). Surpreendentemente, o nível evidente de turbidez mostrou um aumento dependente de concentração de poli-IgG modesto em comparação com o controle positivo que não contém IgG; entretanto, é difícil determinar se o aumento em absorbância foi causado por um aumento no número de partículas ou um aumento em tamanho de partícula médio. A agregação não foi observada no controle negativo (Figura 5, triângulos vermelhos).

[00153] O aumento em turbidez pode ser provavelmente atribuído à liofilização de proteína. Para determinar se o aumento em turbidez foi devido à maneira que a proteína foi processada (isto é, liofilizada), uma mAb de estado sólido em duas maneiras foi preparada; uma que foi não modificada de seu estado de solução purificada, e outra que mimetizou o processo de liofilização do fabricante usado para a preparação de poli-IgG. O anticorpo monoclonal foi liofilizado e reconstituído de acordo com as instruções do fabricante de IgG policlonal para repli-

car o processamento e, então, adicionado a uma solução que contém 0,5 µg de lipase e PS80 0,1% a 25 °C e absorvância a 450 nm foi monitorada por seis horas. O Painel A da Figura 6 mostra um anticorpo monoclonal que não foi liofilizado. O Painel B da Figura 6 mostra o mesmo anticorpo monoclonal que foi liofilizado. O gráfico representa a absorvância em 450 nm como uma função de tempo para várias concentrações de IgG monoclonais. Uma amostra com lipase de controle positivo e PS80, mas sem IgG (losangos abertos) fornece o limite superior para absorvância (~0,55). Uma amostra de controle negativo com PS80 e IgG 10 mg/ml, mas sem lipase (triângulos vermelhos), mostra absorvância de linha de base em 450 nm. O material liofilizado mostrou um aumento similar àquele da poli-IgG, demonstrando que esse aumento ocorreu provavelmente devido ao processo de liofilização.

EXEMPLO 6. MITIGAÇÃO DE FORMAÇÃO DE PARTÍCULA EM UMA PREPARAÇÃO DE ANTICORPO COM HSA *IN-VITRO*

[00154] Para avaliar se HSA pôde mitigar a formação de partícula na presença de IgG policlonal, o ensaio com concentrações crescentes de IgG policlonal, um teste com HSA, IgG policlonal, lipase e PS80 foi realizado.

[00155] FAF-HSA 4,5 mg/ml e FAF-HSA 7,5 mg/ml foram adicionados a amostras que contêm IgG policlonal, 0,5 µg de lipase e PS80 0,1% a 25 °C, e a absorvância a 450 nm foi monitorada por seis horas.

[00156] A Figura 7 representa os gráficos para absorvância a 450 nm como uma função do tempo para adição de FAF-HSA 4,5 mg/ml e FAF-HSA 7,5 mg/ml a várias concentrações de IgG policlonal. Uma amostra com lipase de controle positivo e PS80, mas sem IgG (losangos abertos) fornece o limite superior para absorvância (~0,5) e barras de erro representam o erro padrão de duas replicatas.

[00157] A atividade de inibição de partícula de HSA foi similar àque-

la observada na ausência de IgG policlonal em (Figura 3), o que indica que HSA inibe a formação de partículas até mesmo na presença de outra proteína sérica.

EXEMPLO 7. MITIGAÇÃO DE FORMAÇÃO DE PARTÍCULA EM UMA PREPARAÇÃO DE ANTICORPO COM HSA *IN-VIVO*

[00158] A formação de partícula mediada por lipase rápida e o ensaio de detecção descritos acima demonstraram que HSA pode prevenir a formação de partículas, *in vitro*. Como uma primeira etapa em direção a uma definição *in vivo* mais relevante, a possibilidade de HSA solubilizar partículas pré-existentes foi avaliada.

[00159] Para testar a capacidade de HSA de solubilizar as partículas pré-formadas em solução, as partículas foram preparadas (*Consultar* Materiais e Métodos) e diluídas para obter uma absorbância máxima de ~ 0,5 OD. As partículas pré-formadas foram incubadas com FAF-HSA e a absorbância em 450 nm foi monitorada por seis horas conforme mostrado na Figura 8 (dados exibidos para mostrar 2,5 horas). Uma amostra de controle positivo com lipase e PS80, mas sem HSA (Figura 8, triângulos fechados) fornece o limite superior para absorbância (~ 0,5). Uma amostra de controle negativo com PS80 e HSA 7,5 mg/ml, mas sem lipase (Figura 8, triângulos vermelhos), mostra a absorbância de linha de base em 450 nm e as barras de erro representam erro padrão de três replicatas.

[00160] Mediante adição de FAF-HSA a soluções que contêm níveis elevados de partículas de ácido graxo, a turbidez de solução diminuiu rapidamente; entretanto, nem todas as concentrações de FAF-HSA alcançaram o nível de linha de base (Figura 8). Os platôs observados em concentrações de HSA menores ou iguais a 3,5 mg/ml indicam que as partículas pré-formadas não foram completamente solubilizadas. As concentrações de HSA acima de 5,5 mg/ml foram necessárias para romper completamente as partículas pré-formadas, dentro

dos limites do ensaio de turbidez.

EXEMPLO 8. MITIGAÇÃO DE FORMAÇÃO DE PARTÍCULA EM UMA PREPARAÇÃO DE ANTICORPO COM HSA *IN-VIVO* COM SORO HUMANO

[00161] Experimentos similares como o exemplo 7 também foram realizados com soro humano, o que representa mais aproximadamente as condições fisiológicas. Em particular, a albumina presente no soro é ligada a vários compostos de baixa solubilidade diferentes.

[00162] As partículas pré-formadas foram incubadas com soro humano normal, e a absorvância em 450 nm foi monitorada por seis horas conforme mostrado na Figura 9 (dados para 2,5 horas mostrados como sem mudanças adicionais observadas). Uma amostra de controle positivo com lipase e PS80 mas sem soro (triângulos abertos) fornece o limite superior para absorvância (~ 0,6). Uma amostra de controle negativo com PS80 e soro humano 21%, mas sem lipase foi incluída (dados não mostrados) e obteve uma absorvância de 0,25 OD e as barras de erro representam erro padrão de três replicatas. Devido à absorvância de linha de base de soro humano, cada concentração de soro também foi analisada sem lipase, PS80, ou partículas e os resultados mostrados na Figura 9 representam sinais subtraídos de fundo.

[00163] Quando todas as amostras que contêm soro exibiram uma diminuição em turbidez, apenas aquelas com soro de pelo menos 14% puderam obter uma linha de base indicativa de essencialmente sem partículas em 1,5 horas. Supondo um limite superior da albumina 50 mg/ml em soro humano, isso se iguala a albumina de aproximadamente 7,5 mg/ml em linha com a quantidade de FAF-HSA necessária para obter uma linha de base de turbidez zero.

[00164] Desse modo, um uso inovador e potencialmente benéfico para albumina sérica humana na indústria biofarmacêutica foi constatado. HSA pode mitigar a formação de partícula de ácido graxo, indi-

cando a inclusão de HSA como um excipiente pode auxiliar a estender a meia-vida de certos produtos de fármaco que contêm polissorbato. De modo importante, HSA também pode solubilizar partículas pré-existentes em solução, sugerindo que concentrações fisiológicas de HSA pode eliminar de modo eficiente e eficaz as partículas, se presentes, pós-administração de um produto de fármaco.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para prevenir ou reduzir a formação de partículas de ácido graxo em uma formulação capaz de formar partículas de ácido graxo caracterizado pelo fato de que compreende adicionar à formulação uma quantidade eficaz de albumina de soro humano.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a formulação compreende um polissorbato.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a formulação compreende uma ou mais proteínas adicionais.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as partículas de ácido graxo compreendem um ácido graxo livre.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as partículas de ácido graxo compreendem um ácido graxo livre selecionado a partir do grupo que consiste em ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico e combinações dos mesmos.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a concentração da albumina de soro humano na formulação é de pelo menos cerca de 5,5 mg/mL.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o método reduz a formação de partículas de ácido graxo que compreendem um ácido graxo livre com cerca de seis a cerca de vinte e dois átomos de carbono.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a formulação é uma formulação parentérica.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o método reduz as partículas de ácido graxo que formam partículas visíveis ou subvisíveis.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que um mole da albumina de soro humano se liga a pelo menos meio mole de um ácido graxo livre contido nas partículas de ácido graxo.

11. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as partículas de ácido graxo têm pelo menos 10 μm de tamanho.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as partículas de ácido graxo são detectadas por meio de espectroscopia Raman.

13. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o polissorbato é selecionado a partir do grupo que consiste em polissorbato 20, polissorbato 40, polissorbato 60, polissorbato 80 e uma combinação dos mesmos.

14. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a concentração do polissorbato na formulação é a partir de cerca de 0,001 % p/v a cerca de 1 % p/v.

15. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a proteína adicional é um anticorpo.

16. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a proteína adicional é um anticorpo monoclonal.

17. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a proteína adicional é um anticorpo policlonal.

18. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a proporção de moléculas de ácido graxo livre para moléculas da albumina de soro humano na formulação é de cerca de 6:1 a cerca de 1:1.

19. Método de solubilização de partículas de ácido graxo formadas em uma formulação caracterizado pelo fato de que compreende adicionar à formulação uma quantidade eficaz de albumina de

soro humano.

20. Formulação caracterizada pelo fato de que compreende:

um agente farmacêutico ativo,
um polissorbato, e
albumina de soro humano.

21. Formulação de proteína, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que o agente farmacêutico ativo compreende um anticorpo monoclonal.

22. Formulação de proteína, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que o agente farmacêutico ativo compreende um anticorpo policlonal.

23. Formulação de proteína, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que o agente farmacêutico ativo compreende um anticorpo terapêutico.

24. Formulação de proteína, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que o polissorbato é selecionado a partir do grupo que consiste em polissorbato 20, polissorbato 40, polissorbato 60, polissorbato 80 ou uma combinação dos mesmos.

25. Formulação de proteína, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende ainda uma enzima lipase.

26. Formulação de proteína, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que a concentração da albumina de soro humano na formulação de proteína é de pelo menos cerca de 5,5 mg/mL.

27. Formulação de proteína, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que a formulação é uma formulação parentérica.

28. Formulação de proteína, de acordo com a reivindicação

20, caracterizada pelo fato de que o polissorbato se degrada para formar partículas de ácido graxo.

29. Formulação de proteína, de acordo com a reivindicação 28, caracterizada pelo fato de que as partículas de ácido graxo compreendem um ácido graxo livre.

30. Formulação de proteína, de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que o ácido graxo livre é um ácido alifático com cerca de seis a cerca de vinte e dois carbonos.

31. Formulação de proteína, de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que o ácido graxo livre é ácido oleico.

32. Formulação de proteína, de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que o ácido graxo livre é selecionado a partir do grupo que consiste em ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico e combinações dos mesmos.

33. Formulação de proteína, de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que a proporção de moléculas de ácido graxo livre para moléculas da albumina de soro humano na formulação é de cerca de 6:1 a cerca de 1:1.

34. Formulação de proteína, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que a concentração do polissorbato na formulação de proteína é a partir de cerca de 0,001 % p/v a 1 % p/v.

FIG. 1

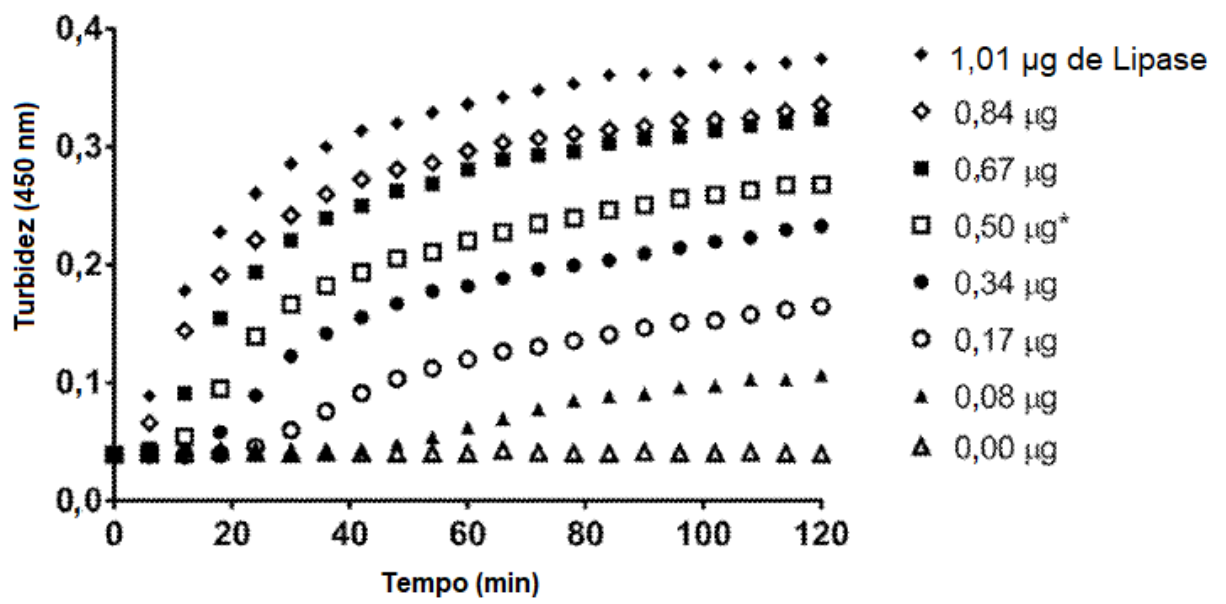


FIG. 2

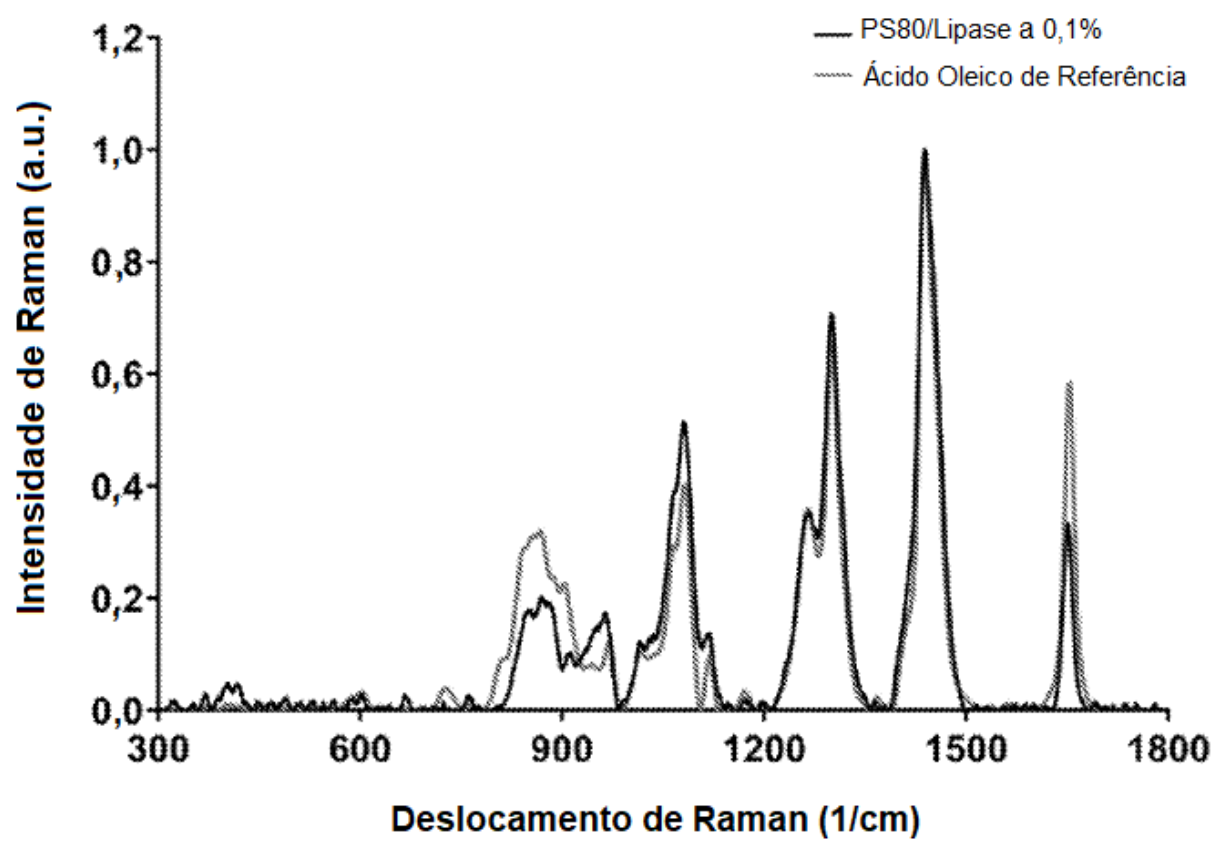


FIG. 3

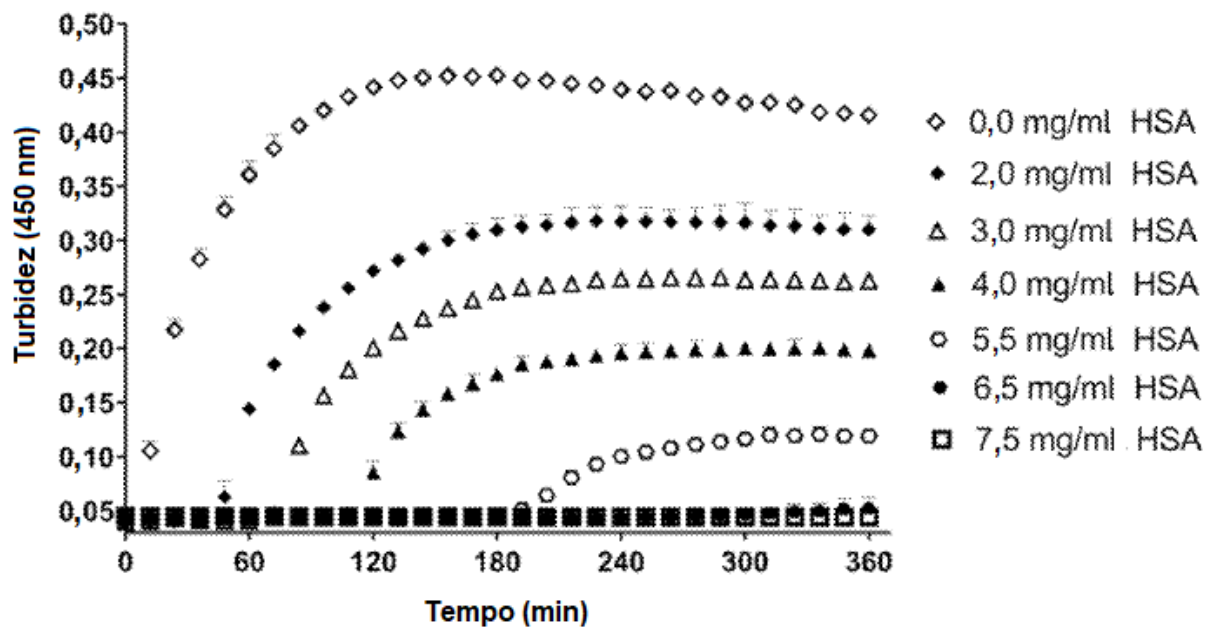


FIG. 4

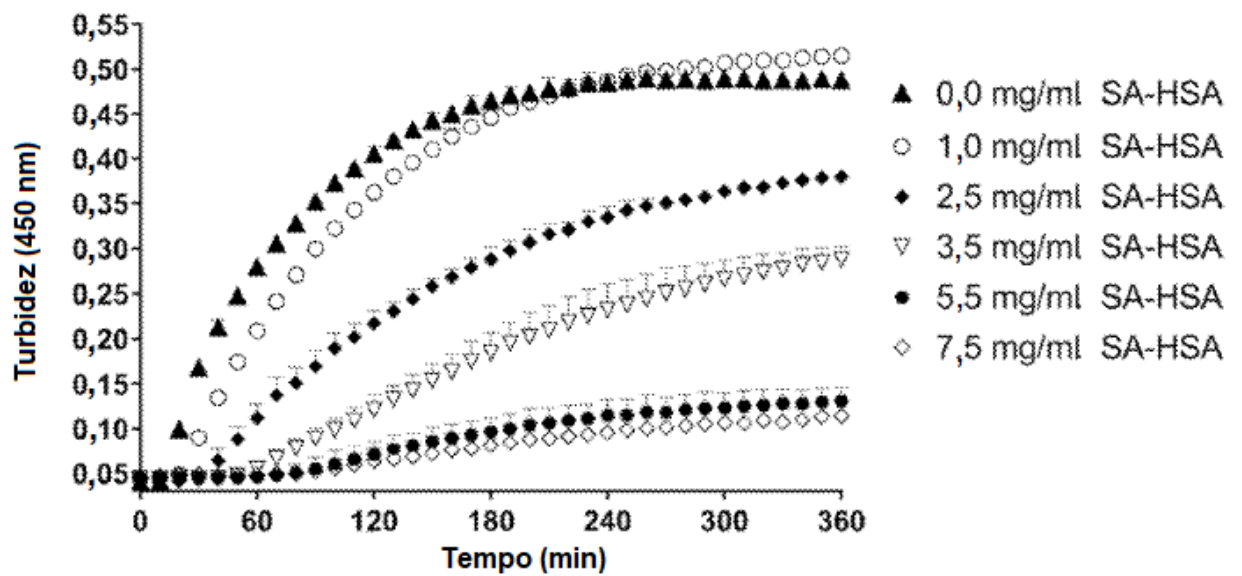


FIG. 5

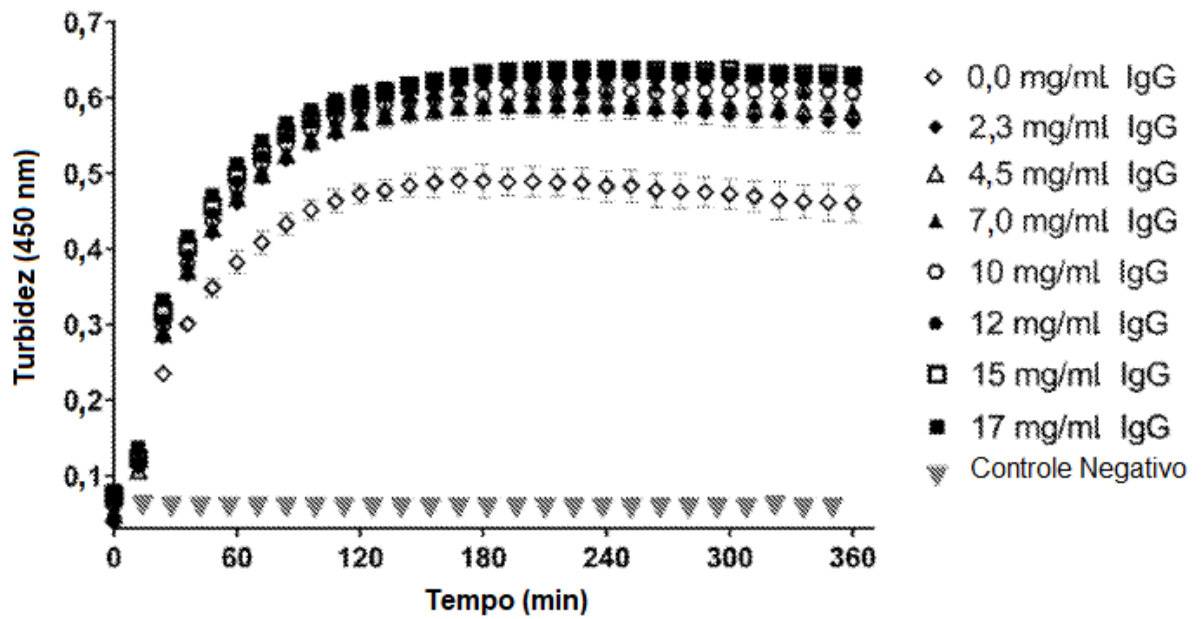


FIG. 6

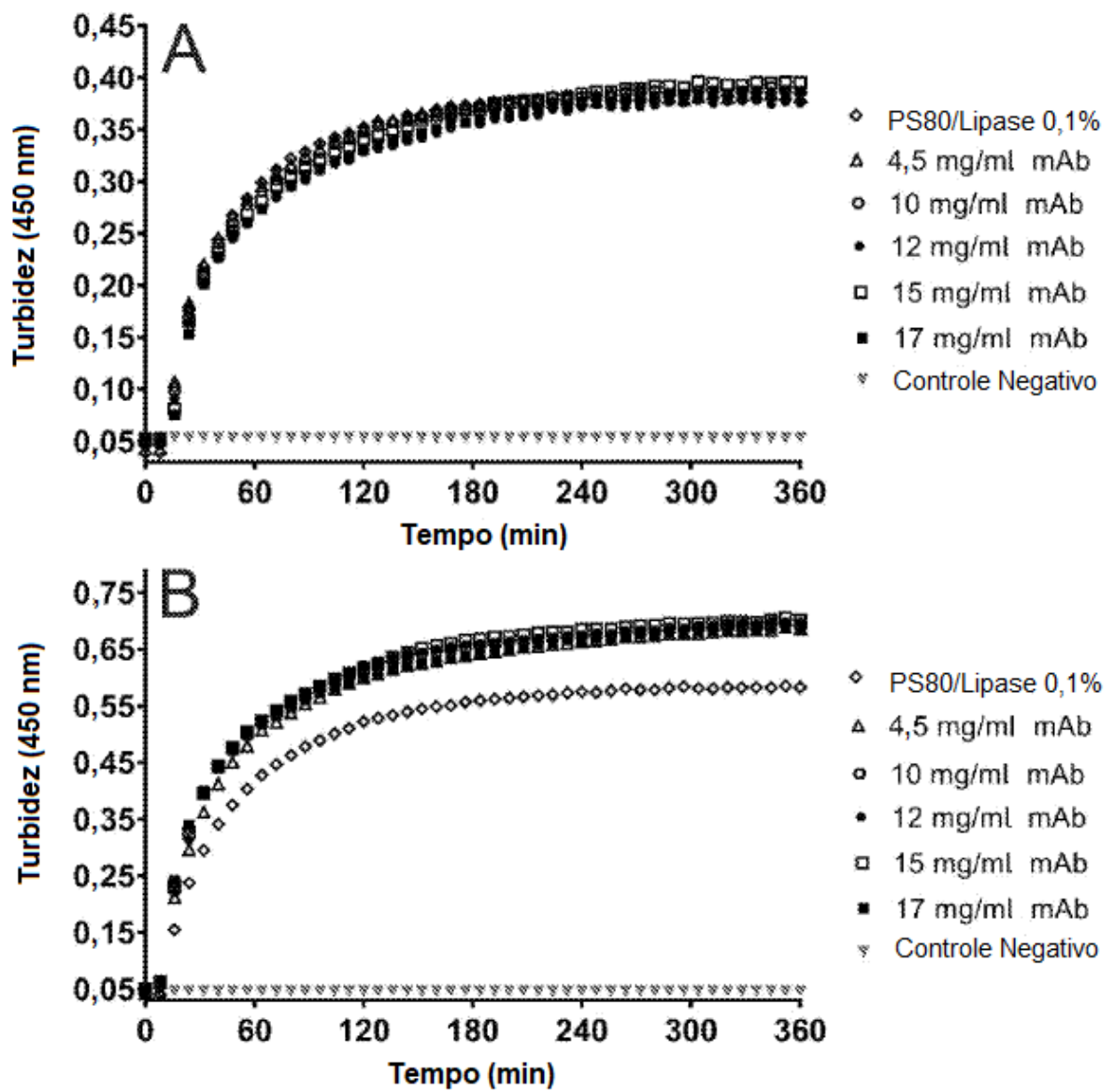


FIG. 7

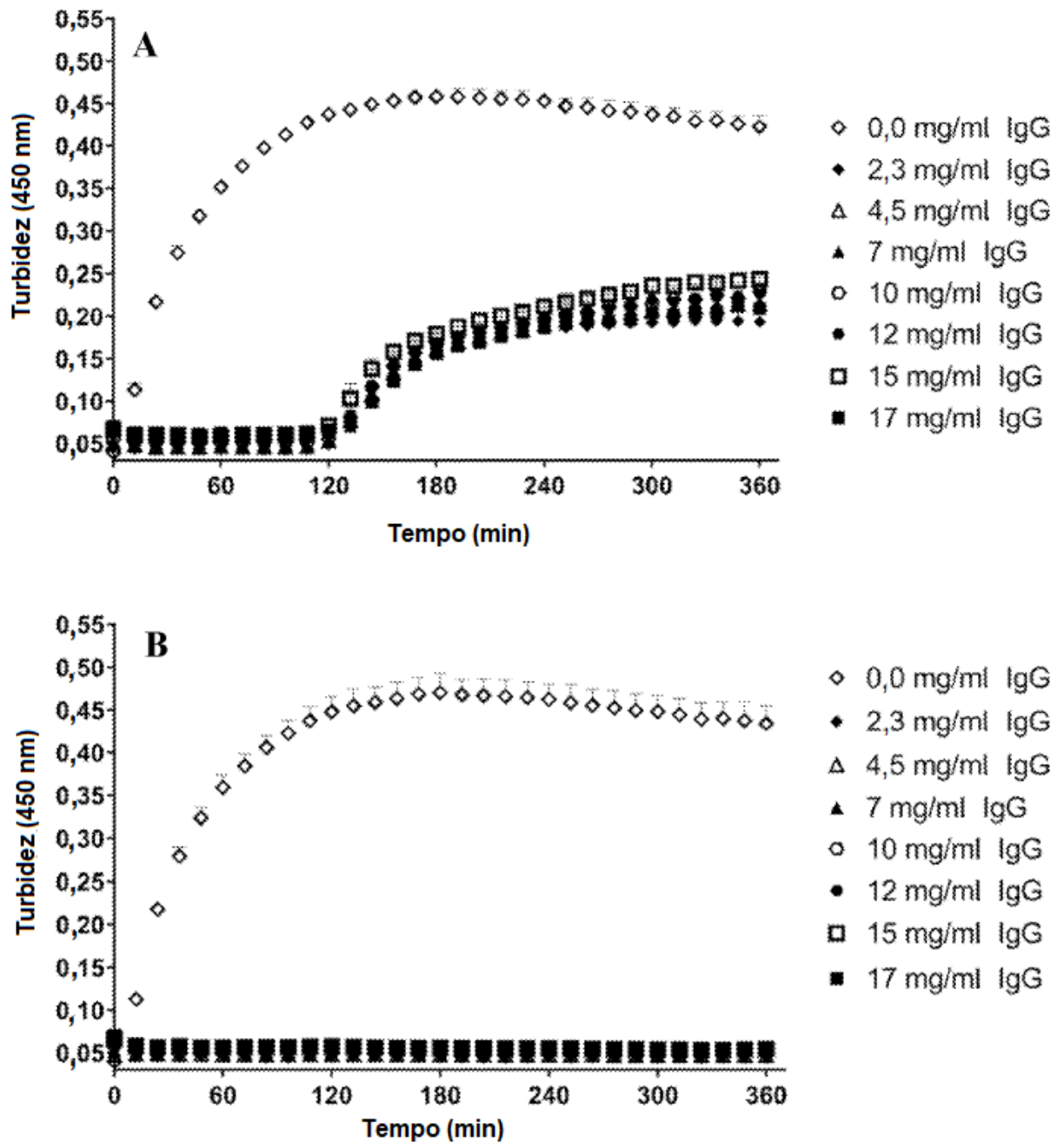


FIG. 8

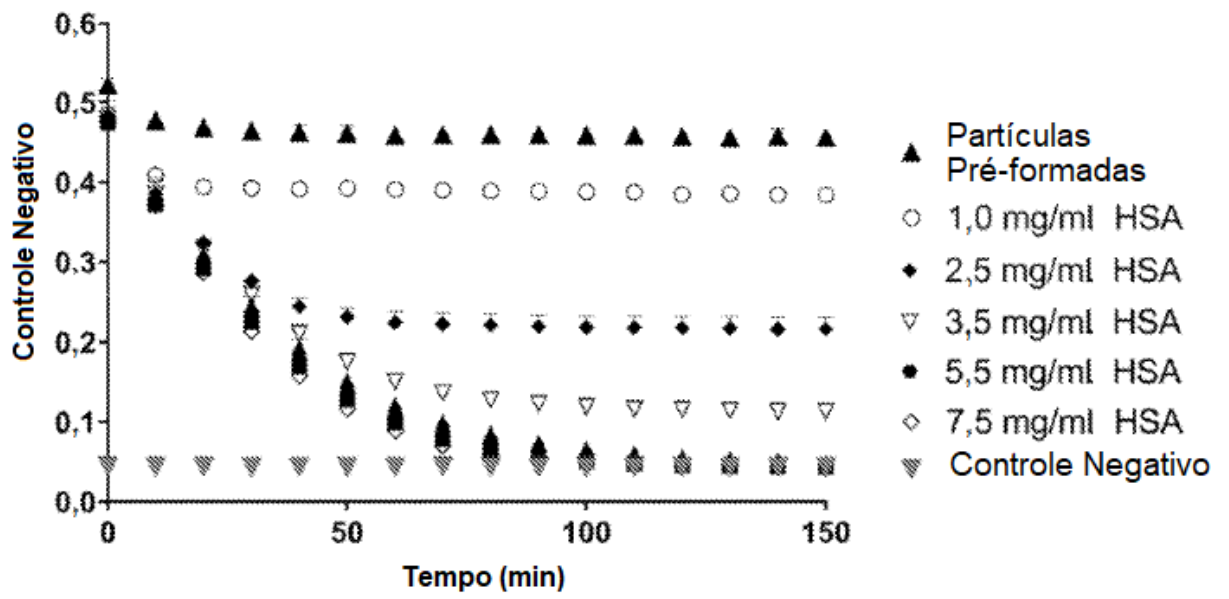
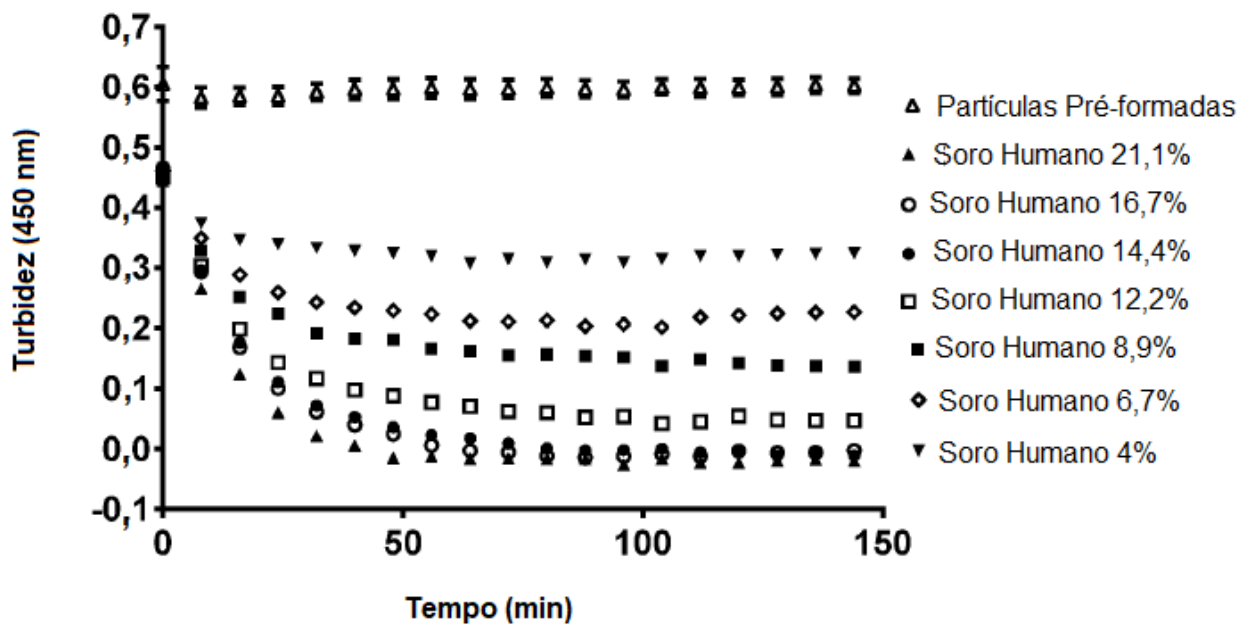


FIG. 9



RESUMO

Patente de Invenção: "**ALBUMINA DE SORO HUMANO EM FORMULAÇÕES**".

A presente invenção refere-se a formulações medicamentosas e a métodos para remover, reduzir ou prevenir a formação de partículas de ácido graxo em formulações medicamentosas.