FORMULACIÓN ESTABLE Y DE ALTA CONCENTRACIÓN DEL ANTICUERPO NIMOTUZUMAB

CAMPO DE LA TÉCNICA

La presente invención se relaciona con las ramas de la Biotecnología y la Medicina, especialmente con la obtención de una formulación altamente concentrada y estable del anticuerpo monoclonal humanizado nimotuzumab para ser administrado por vía subcutánea (SC) o intramuscular (IM) en el tratamiento del cáncer.

ANTECEDENTES

El anticuerpo monoclonal (AcM) humanizado nimotuzumab reconoce al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano Her1 es de isotipo IgG1 y se obtuvo mediante el clonaje del ADN de las regiones hipervariables del AcM de ratón ior egf/r3 y los marcos de las regiones variables y de las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera de origen humano (REI y NEWN, respectivamente) (Mateo, C. y otros. (1997), Immunotechnology 3: 71-81). La eficacia del nimotuzumab se ha demostrado en ensayos clínicos, en pacientes con tumor de cabeza y cuello (Crombet, T. y otros. (2004) J Clin Oncol. 22:1646-1654), glioma (Ramos, T. y otros. (2006) Cancer Biol Ther. 5: 375-379; MacDonald, T. y otros. (2011) Neuro Oncol. 13: 1049-1058) y tumor de esófago (Ramos-Suzarte, M. y otros. (2012) Cancer Biology & Therapy 13: 600-605). Este anticuerpo (Ac) se encuentra en ensayos clínicos fase III para cáncer nasofaríngeo, cáncer de esófago localmente avanzado y carcinoma de esófago de células escamosas (Galluzzi, L. y otros. (2012) OncoImmunology. 1: 28-37).

La administración del AcM nimotuzumab se realiza por infusión intravenosa (IV) utilizando una formulación líquida donde dicho Ac se encuentra en una concentración de 5 mg/mL (https://www.cecmed.cu/registro/rcp/cimaher-nimotuzumab). Esta administración se realiza por disolución de cuatro bulbos de nimotuzumab a 5 mg/mL en una bolsa de solución de NaCl al 0.9 %. La composición de la formulación comercial de nimotuzumab comprende además el tampón fosfato de sodio a 15 mM y pH aproximado a 7, cloruro de sodio a 150 mM, y polisorbato 80 a 0.02% (Revista Cubana de Farmacia. 2012; 46(3): 379-380*).* El nimotuzumab en la clínica se aplica en dosis de 200 mg (400 mg en el cáncer de páncreas) una vez por semana durante seis semanas, acompañado de radioterapia y quimioterapia. Luego se administran dosis de mantenimiento de 200mg cada 15 dias hasta que el paciente lo permita. De ahí la importancia de tener una vía de administración que facilite este uso crónico del nimotuzumab sin necesidad de que el paciente tenga que acudir a un centro hospitalario.

Como es conocido la administración IV trae algunas desventajas como los largos períodos de administración, la necesidad de un personal calificado para su administración, el riesgo de infección y las reacciones violentas (Michael F. Haller (2007) Pharmaceutical Technology, 31(10): 118-132).

Debido a ello la tendencia a nivel mundial es hacia una administración SC de los AcMs (Viola M, Sequeira J, y cols. (2018) J Control Release; 286: 301-314) teniendo como ventajas la disminución de los tiempos y volúmenes de administración, la disminución de riesgos de infección e incluso la auto-administración por el propio paciente pues se hace más fácil la manipulación y administración de un único bulbo con la cantidad requerida (Haller M. F. (2007) Pharmaceutical Technology, 31(10): 118-132). Por su parte, la administración IM de fármacos tiene ventajas sobre la IV, como son los menores costos del tratamiento y menores cuidados intensivos. Además, la vía IM tiene menores riesgos de infección y menores tiempos de administración que la vía IV. Adicionalmente, es conocido que la vía IM tiene menor ocurrencia de efectos adversos y de sobredosis. Se debe notar también que la absorción y biodisponibilidad de la vía IM es bastante alta y muy cercana a la IV. (Jing-fen Jin y cols., Patient Preference and Adherence, 2015, 9: 923-942).

Entre los Acs que actualmente se utilizan en la clínica con formulaciones SCs se encuentran el trastuzumab (US 9,345,661) y el rituximab (US 10,280,227), en ambas formulaciones se emplea la enzima hialuronidasa para lograr inyectar un volumen superior a 1,5 mL con buena biodistribución del Ac y que alcance las dosis necesarias para lograr efecto terapéutico (Shpilberg, O. y C. Jackisch. (2013) British Journal of Cancer. 109: 1556-1561).

Otra de las formulaciones altamente concentradas que emplean la enzima hialorunidasa es la descrita en la solicitud de patente CN107898756A. En la misma se reclama una formulación del Ac nimotuzumab en altas concentraciones para uso SC o IM. Según lo reportado en esta patente es necesaria la presencia de hialuronidasa en esta formulación para tener una adecuada permeabilidad.

Existen reportes previos de formulaciones altamente concentradas para Acs contra el factor de crecimiento epidérmico como la descrita en la solicitud de patente WO2011080209 donde se reclama una formulación liquida en alta concentración obtenida por ultrafiltración que comprende un Ac anti-EGFR. Dicha solicitud a pesar de que plantea que la formulación reclamada puede ser empleada para el Ac nimotuzumab, no muestra en la práctica resultados que avalen tal afirmación. Esta solicitud reclama una concentración de Ac desde 1 mg/ml hasta 200 mg/ml no obstante, solamente demuestran hasta una concentración de 50 mg/ml del Ac hu-ICR62. Además, los rangos de excipientes y concentraciones reclamados en esta solicitud son exageradamente

amplios porque incluyen prácticamente todos los excipientes y concentraciones más empleados en el estado del arte. En la presente invención, se demostró que algunas combinaciones de excipientes y concentraciones incluidas en el rango reclamado en WO2011080209 no fueron las más estables ni las mejores opciones de formulacion para el Ac nimotuzumab.

Como principal ejemplo de Ac administrado por vía IM se encuentra el Ac palivuzumab. Este Ac se presenta como una formulación liofilizada que luego de ser reconstituida en agua posee al Ac palivuzumab a 100 mg/mL además de excipientes como histidina, glicina y manitol y se emplea en dosis de 15 mg/kg en el tratamiento del virus respiratorio sincitial.

Lograr en una sola formulación que el Ac mantenga la estabilidad, una baja turbidez y viscosidad es un reto que necesita una metodología de pesquisaje adecuada. Encontrar la combinación de excipientes y condiciones adecuadas para que un Ac cumpla con los requisitos anteriores en alta concentración no se hace trivial ya que hasta el momento no se puede predecir *a priori* que combinación es efectiva para un Ac especifico ya que cada uno es diferente y se comporta diferente en cuanto los mecanismos principales de degradación (Manning M.C. y cols. (2018) Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, 112: 1-59; Viola M, Sequeira J, y cols. (2018) J Control Release; 286: 301-314).

Los inventores de la presente invención encontraron formulaciones para el Ac nimotuzumab distintas a las ya reportadas y con una combinación especifica de excipientes, que garantiza su estabilidad, baja turbidez y baja viscosidad, además de ser más simples al prescindir de la enzima hialuronidasa para garantizar una estabilidad y permeabilidad adecuadas para el caso de la formulación SC. Se logra además con estas formulaciones específicas, alcanzar concentraciones de entre 100 y 180 mg/mL de nimotuzumab permitiendo así poder aumentar la dosis del Ac sin aumentar el volumen de administración. El empleo de estas formulaciones por via SC o IM facilita su uso cuando se necesita una administración crónica con dosis entre 200 mg y 360 mg para la via SC y entre 200 – 720 mg para la IM, con la ventaja de que pueden ser auto-administradas por el paciente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En una realización es objeto de la presente invención formulaciones farmacéuticas altamente concentradas y estables del Ac monoclonal nimotuzumab que comprenden al AcM nimotuzumab en un rango de concentración entre 100 y 210 mg/mL, una sustancia tampón en un rango entre 5 y 30 mM, proporcionando un valor de pH de 6.5 ± 0.5, un surfante en un rango entre 0.02 y 0.06 %, un aminoácido o una mezcla de ellos en un

rango entre 30 y 150mM y opcionalmente un carbohidrato como estabilizante en un rango entre 2 y 6 %.

Particularmente, la sustancia tampón de dichas formulaciones se selecciona entre el tampón histidina y el fosfato de sodio. El surfactante se selecciona entre el polisorbato 20 y polisorbato 80. Los aminoácidos se seleccionan entre la L-metionina y la glicina. El carbohidrato que se emplea en la formulación es la sacarosa.

Más particularmente, las formulaciones anteriores pueden estar en forma líquida o liofilizada. La formulación líquida en una concentración de 150 mg/mL tiene una viscosidad ≤ 5cP.

Además es objeto de la presente invención el uso de las formulaciones farmacéuticas antes descritas en el tratamiento del cáncer. Particularmente, se describe un método de tratamiento a un paciente que lo necesite que comprende la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en la presente invención en una dosis entre 200 mg/70kg - 750 mg/70kg por vía SC o por vía IM. Empleando un volumen de inyección entre 1.3 - 2 mL, y concentraciones entre 150 y 200 mg/mL se logra la administracion SC de este Ac. Además, esta inoculación se puede distribuir en uno o varios sitios de inyección cuando se necesitan dosis mayores del Ac. En el caso de la vía IM el volumen de inyección va desde 1.3 a 5 mL para la concentracion de 150 mg/mL y dosis desde 200 hasta 750 mg/70kg. En el caso de emplear una concentracion de 200 mg/mL y volúmenes intramusculares de 1.3 - 5 mL se alcanzarían dosis de 260-1000 mg/70kg.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Obtención de formulaciones estables en alta concentración de AcM nimotuzumab

La presente invención está relacionada con formulaciones en altas concentraciones del AcM nimotuzumab al que también nos referiremos en la presente como hR3. La concentración del nimotuzumab en las formulaciones que se describen en la presente invención esta en un rango entre 100 y 210 mg/mL, preferentemente entre 100 y 180 mg/ml. Las formulaciones de nimotuzumab descritas en esta solicitud comprenden una sustancia tampón, un surfactante, aminoácidos y opcionalmente un carbohidrato. La sustancia tampón puede ser tampón histidina o fosfato de sodio ambos en un rango entre 5 y 30 mM, lo que posibilita mantener el pH de la formulación en un rango de pH de 6.5 ± 0.5. Las formulaciones de la presente invención pueden comprender como surfactante polisorbato 20 o polisorbato 80 en un rango de concentración entre el 0.02 y 0.06 %. Los carbohidratos pueden ser sacarosa y trehalosa con una concentración entre un 2 y 6 %. Adicionalmente, los aminoácidos se seleccionan entre L-metionina o glicina, o ambos en un rango de concentración entre 30 y 150mM.

Para obtener estas formulaciones se puede emplear un sistema de ultrafiltración-diafiltración (UF/DF) del tipo Amicon Ultra con membrana de celulosa con tamaño de poro entre 30-50kD. Para diafiltrar o concentrar la muestra se puede emplear una velocidad de centrifugación en el rango de 900-1100 g a temperaturas entre 2-8°C. La muestra se somete a una filtración esterilizante donde dependiendo del volumen de la misma así será el tipo de filtro a emplear. Otra manera en que pueden prepararse las formulaciones descritas en la presente invención es mediante un sistema de filtración en flujo tangencial a escala de laboratorio o piloto. Para ello se pueden emplear membranas con poros de 30 y 50kD. La diafiltración de las muestras para realizar cambio de tampón se hace empleando entre 10-15 diavolúmenes de tampón final. Para concentrar las muestras se debe reducir el volumen inicial a un volumen menor del volumen calculado que corresponde a la concentración deseada.

Estas formulaciones pueden obtenerse mediante una estrategia de pesquisaje por etapas seleccionando primeramente los mejores tampones y valores de pH. Luego una segunda etapa seleccionando las mejores sales, surfactantes y carbohidratos y posteriormente una tercera etapa para seleccionar los mejores aminoácidos para la formulación. Otra variante a emplear puede ser mediante un pesquisaje simultáneo donde se empleen los distintos tipos de excipientes con sus distintas combinaciones según un diseño factorial. En este caso se tiene en una misma formulación la posibilidad de interacción entre más de 2 o 3 excipientes.

Otro aspecto de la invención contempla la liofilización de las formulaciones antes descritas y su posterior reconstitución así como un método para preparar una formulación reconstituida isotónica y estable. Dicho método comprende la reconstitución de la mezcla liofilizada de Ac y estabilizantes en los tampones antes descritos de forma tal que la concentración de Ac en la formulación reconstituida sea al menos 100 mg/mL y como máximo 210 mg/mL, siendo esta de 3-5 veces mayor que la concentración de Ac en la mezcla antes de la liofilización.

Determinación de la estabilidad de las formulaciones en alta concentración de nimotuzumab

Para comprobar las variantes de formulaciones más estables y la influencia de cada excipiente en la estabilidad se realiza un estudio de los parámetros predictores de estabilidad mediante dispersión de luz dinámica (DLS). Estos son el parámetro de interacción por difusión (kD), el potencial Z y la temperatura de agregación (Tagg). La determinación de kD se realiza mediante la medición del coeficiente de difusión para la curva de concentración de nimotuzumab desde 12 mg/ml hasta 2 mg/mL. La Tagg se determina a partir de las muestras iniciales y con una rampa de temperatura desde 25

hasta 76°C y el potencial Z se determina por medición de la muestra a la concentración inicial.

Otro de los métodos empleados para determinar las mejores formulaciones es el estudio de estrés, donde se someten las muestras a una temperatura de 50°C en un baño térmico por un tiempo de entre 10 a 20 días y luego se analizan a distintos intervalos de tiempo por determinaciones fisicoquímicas y biológicas.

Dentro de estas mediciones se encuentra la medición de turbidez mediante la absorbancia de las muestras en el espectro UV entre 340 y 450 nm, lo que permite detectar la formación de agregados de gran tamaño. La determinación del tamaño de partícula mediante DLS en el cual se mide la muestra intacta sin diluir en su concentración inicial con el objetivo de detectar la formación de agregados o partículas en la solución. La medición de viscosidad que se lleva a cabo para las muestras de alta concentración empleando un patrón de tamaño para DLS en un rango entre 100-500 nm nominal, preferiblemente 200 nm nominal.

A las muestras también se les realizan análisis mediante SDS-PAGE para determinar la formación de fragmentos durante el estrés. En este caso se utilizaron condiciones no reductoras con geles de 7.5% y tinción de Coomassie o nitrato de plata. Se realiza además la determinación de pureza de monómero mediante cromatografía de exclusión molecular de alta resolución (SEC-HPLC).

La actividad biológica del Ac determina la potencia relativa respecto al material de referencia del nimotuzumab y se puede realizar mediante citometría de flujo o por inhibición de la proliferación celular en una línea celular que exprese el Her1 humano.

Métodos de tratamiento

Las formulaciones objeto de la presente invención pueden tener aplicación en el tratamiento de pacientes con tumores de cabeza y cuello, glioma, esófago, pulmón y páncreas. Para su uso terapéutico, dichas formulaciones se deben administrar a un sujeto portador de la enfermedad de forma independiente o combinados con terapias convencionales para el tratamiento del cáncer como radioterapia o quimioterapia, para que potencien su acción terapéutica.

La administración de las mismas se realiza por vía SC o IM. En el caso de la vía SC se emplea un volumen mínimo de muestra de 1.33 mL para la dosis de 200 mg/70kg. Para dosis mayores se puede aumentar el volumen de inyección hasta 2 mL y alcanzar una dosis de 300/70kg. En caso de ser necesario dosis mayores de 300 mg/70kg se puede emplear una concentración de Ac mayor de 150 mg/mL o utilizar dos sitios de inyección, dichos sitios pudieran ser cualquiera de las regiones deltoideas, región abdominal y región delantera de los muslos, sin limitarse a estas. Por ejemplo para la dosis que se

usa en la mayoría de los tratamientos de 200 mg por semana bastaría solamente con una concentración de 134 mg/mL de nimotuzumab para efectuar el tratamiento. En el caso de una dosis mayor se puede emplear una concentración mayor de nimotuzumab hasta 210 mg/mL. Para el tratamiento de cáncer de páncreas con dosis de 400 mg se emplearían dos sitios de inyección.

Según lo reportado en la literatura el volumen de administración IM máximo permitido es de 5mL, por lo que cuando se emplea esta vía de administración, el volumen de inyección puede variar entre 1.3 – 5 mL para la concentración de 150 mg/mL y dosis entre 200 y 750 mg. Cuando se emplean concentraciones de 200 mg/mL la dosis puede llegar hasta 1000 mg.

La presente invención queda aún más elaborada con los siguientes ejemplos y dibujos. Sin embargo, estos ejemplos no deberían ser interpretados como una limitación del ámbito de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Valores de kD para las variantes de formulación de AcM hR3 determinadas por DLS.

Figura 2: Valores de kD para las diferentes formulaciones de AcM hR3 con presencia de aminoácidos determinados por DLS.

Figura 3: Gráfico de tamaño de partícula de las formulaciones de AcM hR3 con presencia de aminoácidos determinados por DLS.

Figura 4: Tamaño de partícula para formulaciones de AcM hR3 a 150 mg/mL y almacenadas a 4°C durante 3 meses medidas por DLS.

Figura 5: Viscosidad de formulaciones de AcM hR3 a 150 mg/mL y almacenadas a 4°C durante 3 meses medidas por DLS.

Figura 6: Pureza de monómero de formulaciones de AcM hR3 a 150 mg/mL y almacenadas a 4°C durante 3 meses medidas por DLS.

Figura 7: Efecto antitumoral del AcM nimotuzumab administrado por vía IV y SC a dosis de 50 mg/kg en ratones Balb/c atímicos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Pesquisaje de excipientes de formulación para AcM nimotuzumab.

Se prepararon 9 variantes de formulación a partir de un diseño factorial de 4 factores y ½ de fracción según se muestra en la Tabla 1, la variante hR3sol9 corresponde con la formulación original del AcM hR3. Las soluciones después de preparadas se filtraron por filtros de 0.2µm y se almacenaron a 4°C.

Tabla 1. Composición de las distintas variantes de formulación de AcM hR3 en el pesquisaje de excipientes.

Composición de diferentes formulaciones de AcM hR3									
	hR3 sol1	**hR3 sol2**	**hR3 sol3**	**hR3 sol4**	**hR3 sol5**	**hR3 sol6**	**hR3 sol7**	**hR3 sol8**	**hR3 sol9**
Tampón Fosfato de Sodio 15mM a pH 6	+	-	+	-	+	-	+	-	Tampón Fosfato de Sodio 15mM a pH 7
Tampón Histidina 15mM a pH 6	-	+	-	+	-	+	-	+	-
NaCl a 75mM	+	+	-	-	-	+	+	-	NaCl a 150mM
Sacarosa 5%	+	-	-	+	-	-	+	+	-
Trehalosa 5%	-	-	+	+	-	+	+	-	-
Polisorbato 20 a 0.05%	+	-	-	+	+	+	-	-	-
Polisorbato 80 a 0.05%	-	+	+	-	-	-	+	+	Polisorbato 80 a 0.02%
(+):presencia del excipiente en la formulación (-):ausencia del excipiente en la formulación									

Una vez preparadas las soluciones se realizó el cambio de tampón mediante UF/DF en tubos Amicon Ultra de 50kD de tamaño de poro, membrana de celulosa regenerada y 15mL de volumen. Las muestras se centrifugaron a 936 g a una temperatura de 4°C. Como producto de partida se usó el AcM hR3 en solución tampón fosfato de sodio 15 mM, cloruro de sodio 150 mM y Tween 80 a 0.2 mg/mL a pH 7. Luego de preparadas las formulaciones a una concentración de Ac de 10 mg/mL se realizó la medición del parámetro de interacción por difusión (kD) mediante DLS.

En la Figura 1 se puede observar que las variantes con valores más altos de kD y por tanto con interacciones proteína-proteína más favorables a la estabilidad y menos tendencia a la agregación fueron las variantes hR3sol8 y hR3sol 3, luego le sigue la variante hR3sol4 lo cual nos indica el efecto estabilizante del carbohidrato en la formulación. Además otra observación de este resultado es que el valor de kD para la variante hR3sol8 fue mucho mayor que para la variante hR3sol3 lo cual sugiere que la combinación de histidina y sacarosa es más favorable en la estabilidad que la combinación de fosfato con trehalosa. En ninguna de las mejores variantes se encuentra la presencia del NaCl por lo que significa que este desfavorece la estabilidad del AcM hR3.

Otra de los experimentos realizados para comprobar las variantes más favorables a la estabilidad fue el estrés a 50°C durante 14 días. Las muestras después de ser sometidas al estrés fueron analizadas mediante SEC-HPLC para determinar la pureza del monómero. En la Tabla 2 se observa que las variantes de mayor pureza de monómero fueron la hR3sol8 y la hR3sol3 lo cual coincide con los resultados de la kD. Las variantes

de menor pureza de monómero fueron la hR3sol9 y la hR3sol2 las cuales poseen cloruro de sodio en su composición mostrándose una vez más el efecto negativo de este excipiente en la estabilidad sin influir el tipo de tampón.

Tabla 2. Valores de pureza de monómero por SEC-HPLC para formulaciones de AcM hR3 después de ser sometidas a estrés de 50°C durante 14 días.

Pureza de monómero por SEC-HPLC (altura de pico normalizada)									
Tiempo(días)	**hR3 sol1**	**hR3 sol2**	**hR3 sol3**	**hR3 sol4**	**hR3 sol5**	**hR3 sol6**	**hR3 sol7**	**hR3 sol8**	**hR3 sol9**
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	78.19	71.85	85.99	87.66	83.55	74.94	83.16	91.71	72.12
8	66.40	55.63	79.65	80.62	74.71	63.82	75.53	81.02	55.40
11	61.54	47.59	73.38	75.04	67.46	53.14	66.74	75.19	45.46
14	54.38	38.50	68.89	64.01	61.99	49.19	61.60	71.73	39.31

Basándonos en los resultados anteriores concluimos que las variantes de formulación de AcM hR3 que son más estables son las que poseen en su composición algún carbohidrato como sacarosa y trehalosa en ausencia de cloruro de sodio. Además la combinación de sacarosa con histidina favorece mucho más la estabilidad que la combinación de fosfato con trehalosa.

Ejemplo 2. Pesquisaje de aminoácidos para la formulación de AcM hR3.

Se prepararon diferentes soluciones a partir de las dos mejores variantes del pesquisaje de excipientes y se añadió a cada una un aminoácido (L-arginina, L-metionina, glicina). El método de preparación fue semejante al del pesquisaje de excipientes del Ejemplo 1. En la Tabla 3 se muestran las variantes de formulación del AcM hR3 que contienen los distintos aminoácidos.

Tabla 3. Composición de diferentes formulaciones de AcM hR3 con presencia de aminoácidos.

Composición de diferentes formulaciones de AcM hR3									
	hR3 sol30	**hR3 sol31**	**hR3 sol32**	**hR3 sol33**	**hR3 sol80**	**hR3 sol81**	**hR3 sol82**	**hR3 sol83**	**hR3 sol90**
Tampón Fosfato de Sodio 15mM a pH 6	+	+	+	+	-	-	-	-	Tampón Fosfato de Sodio 15mM a pH 7
Tampón Histidina 15mM a pH 6	-	-	-	-	+	+	+	+	-
NaCl a 75mM	-	-	-	-	-	-	-	-	NaCl a 150mM
Sacarosa 5%	-	-	-	-	+	+	+	+	-

Trehalosa 5%	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Polisorbato 80 a 0.05%	+	+	+	+	+	+	+	+	Polisorbato 80 a 0.02%
L-Arginina 50mM	-	+	-	-	-	+	-	-	-
L-Metionina 50mM	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Glicina 50mM	-	-	-	+	-	-		+	-
(+):presencia del excipiente en la formulación (-):ausencia del excipiente en la formulación									

Se realizó la medición de kD mediante DLS cuyos resultados se muestran en la Figura 2. En esta se puede observar que las variantes de mayor valor de kD fueron la hR3sol80, hR3sol81, hR3sol82 y hR3sol32; de ellas las más estables fueron las que poseen tampón histidina. También es notable que para ambos tampones la presencia de metionina produce valores altos de kD lo cual no ocurre con los otros aminoácidos.

Las distintas formulaciones se sometieron a estrés de 50°C durante 15 días en un baño térmico y se midió el diámetro de partícula por DLS a los 0, 5, 12 y 15 días. La Figura 3 muestra los resultados de estas mediciones. Se puede ver que las variantes con menor diámetro de partícula y por tanto con menor agregación son las variantes hR3sol80, hR3sol82 y hR3sol83. Esto confirma lo visto anteriormente donde las formulaciones con tampón histidina son más estables que las de tampón fosfato y además que las variantes con L-metionina o glicina son más estables que las que poseen L-arginina.

Adicionalmente en la Tabla 4 se muestran los valores de pureza de monómero de las formulaciones sometidas a estrés de 50°C.

Tabla 4. Valores de pureza de monómero normalizada para formulaciones de AcM hR3 a 5 mg/mL con presencia de aminoácidos después del estrés a 50°C determinada por SEC-HPLC.

Pureza de monómero por SEC-HPLC (altura de pico normalizada)									
Tiempo(días)	**hR3 sol30**	**hR3 sol31**	**hR3 sol32**	**hR3 sol33**	**hR3 sol80**	**hR3 sol81**	**hR3 sol82**	**hR3 sol83**	**hR3 sol90**
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	78.72	74.91	78.61	79.89	87.19	71.19	86.19	82.17	64.65
12	65.04	57.99	63.05	63.44	73.92	52.75	76.19	60.53	51.20
15	58.89	52.11	58.60	61.16	65.05	44.68	72.28	49.17	39.72

La Tabla 4 muestra que las variantes de mayor pureza de monómero después del estrés son la hR3sol82 y luego la hR3sol80. Esto nos indica que las variantes que poseen tampón histidina son más estables que las de tampón fosfato. Además sugiere que la presencia de metionina mejora la estabilidad respecto a la formulación sin aminoácidos. Por el contrario las formulaciones de menor pureza fueron la hR3sol81 y la hR3sol90.

Esto nos sugiere que existe un efecto desestabilizante tanto de la L-arginina como del cloruro de sodio en las formulaciones de AcM hR3. Según los resultados anteriores la formulación de AcM hR3 que posee tampón histidina a pH6, sacarosa, polisorbato 80 y L-metionina es la más estable.

Estos resultados confirman que las variantes hR3sol2, hR3sol6, hR3sol31, hR3sol81 y hR3sol90 que están incluidas en el rango de combinaciones reclamado por la patente WO2011080209, no son recomendables para el Ac nimotuzumab debido a su baja estabilidad lo cual afecta la eficacia y seguridad de las mismas en el paciente. Lo anterior cosolida el concepto reportado en la literatura de que las formulaciones que son estables para una proteina no lo son necesariamente para otra debido a las diferencias estructurales de cada proteina.

Ejemplo 3. Estudio de estabilidad anaquel de AcM hR3 en alta concentración a 4°C

Se realizó una caracterización de la estabilidad de las variantes hR3sol80, hR3sol82 y hR3sol90 a 150 mg/mL de Ac almacenadas a 4°C. A las muestras se les realizó análisis físico químico de diámetro de partícula y viscosidad por DLS y pureza de monómeros por HPLC a los 0 y 3 meses.

En la Figura 4 se muestra el diámetro de partícula obtenido por DLS para las distintas variantes. Aquí se observa que en cada una de las formulaciones el diámetro se mantuvo constante durante los 3 meses, lo cual indica la no ocurrencia de agregación en las muestras a altas concentraciones. Sin embargo es de notar que el diámetro de partícula para la variante hR3sol90 desde el tiempo inicial es de alrededor de 25nm, siendo mayor que el de las otras formulaciones. Esto sugiere una mayor tendencia a la autoasociación entre moléculas en esta variante con respecto a las variantes hR3sol80 y hR3sol82.

En la Figura 5 se muestran los valores de viscosidad medidos por DLS con un patrón de tamaño de partícula de 200 nm. En todos los casos la viscosidad tuvo muy pequeñas variaciones lo que indica que no hay efecto de agregación o autoasociación en esta propiedad. Además es muy importante notar que todos los valores estuvieron por debajo de los 5cP lo cual está bastante lejos de los límites establecidos para una adecuada inyectabilidad y manufacturabilidad (Li Li, Sandeep Kumar y cols. Pharm Res (2014) 31:3161–3178). Además los valores de viscosidad son menores que la de otros Acs a una concentración de 150 mg/mL.

En la Figura 6 se muestra el gráfico de pureza de monómero por SEC-HPLC, según se observa la pureza del monómero no tiene cambios considerables y por tanto nos sugiere que las formulaciones de AcM hR3 a 150 mg/mL son estables almacenadas a 4°C.

Adicionalmente se realizó la determinación de la actividad biológica de las formulaciones de AcM hR3 a 150 mg/mL sin estresar a tiempo 0 y 3 meses. La actividad biológica fue medida por el reconocimiento del AcM hR3 al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano Her1 mediante citometría de flujo y por inhibición de la proliferación celular. Para el ensayo de citometría de flujo se emplearon $2x10^5$ células H292 por pozo y se realizó una curva de concentración desde 81 µg/mL con diluciones 1/3, para luego determinar la intensidad media de fluorescencia (IMF). A partir de la IMF se determinó el EC50 y se comparó con un material de referencia de hR3 comercial para obtener la potencia relativa. El ensayo de inhibición de proliferación se realizó con células H292 y usando como colorante el WST-1. La absorbancia obtenida se comparó con el material de referencia de hR3 comercial para determinar la potencia relativa. Los resultados de ambas mediciones para tiempo 0 se muestran en la Tabla 5 y en la Tabla 6 a los 3 meses de transcurrido el estudio.

Tabla 5. Actividad biológica de formulaciones de AcM hR3 concentradas a 150 mg/mL sin estrés.

Actividad biológica de AcM hR3 a 150 mg/mL a t0					
Muestra	**Reconocimiento por Citometría (%)**	**Citometría (IMF)**		**Inhibición de proliferación**	
	3µg/mL	PR Citometría	IC	PR Inhibición	IC
hR3sol80 t0	99.11	81	73-89	101	91-113
hR3sol82 t0	99.04	83	78-89	104	78-139
hR3sol90 t0	99.11	79	74-84	93	59-147
PR: potencia relativa en % con respecto a referencia de AcM hR3 comercial IC: intervalo de confianza					

En la Tabla 5 se observa que la potencia relativa para las variantes hR3sol80, hR3sol82 y hR3sol90 estuvo entre 79 y 83% por el ensayo de citometría de flujo, lo cual indica que mantienen su actividad biológica aun en altas concentraciones. Por otro lado los valores de potencia por el ensayo de inhibición estuvieron entre 93 y 104% lo cual confirma el resultado de citometría e indica que las muestras en alta concentración retienen su actividad biológica. Se debe tener en cuenta que cada valor posee un intervalo de confianza debido a la variabilidad intrínseca del experimento en ambos ensayos.

Tabla 6. Actividad biológica de las formulaciones de hR3 a 150 mg/mL a 3 meses de estabilidad a 4°C.

Muestra	**Reconocimiento por Citometría (%)**	**Reconocimiento Citometría (IMF)**		**Inhibición de Proliferación**	
	3 µg/mL	**PR Citometría**	**IC**	**PR Inhibición**	**IC**

hR3Sol 80 3M	93,93	81	56 - 117	77	66 - 89
hR3Sol 82 3M	87,85	46	42 - 49	45	35 - 57
hR3Sol 90 3M	93,76	78	72 - 84	86	69 - 107
PR: potencia relativa en % con respecto a referencia de AcM hR3 comercial IC: intervalo de confianza					

En la Tabla 6 se observa la actividad biológica para las muestras de hR3 a 150 mg/mL a los 3 meses de estabilidad a 4°C. Aquí se puede notar que las muestras de mayor valor de potencia relativa fueron la hR3sol80 y hR3sol90 con valores entre 78 y 81% para el reconocimiento por citometría y entre 77 y 86% por inhibición de proliferación.

Ejemplo 4. Estudio de estrés a 50°C de mejores variantes de formulación del AcM hR3 a 150 mg/mL.

En las variantes de formulación hR3sol80, hR3sol82 y hR3sol90 se llevó a cabo la concentración del hR3 hasta 150 mg/mL mediante UF/DF en tubos Amicon Ultra de 50kD de tamaño de poro, membrana de celulosa regenerada y 15 mL de volumen. Las muestras se centrifugaron a 936 g a una temperatura de 4°C. Una vez alcanzada la concentración de 150 mg/mL se filtraron las muestras en filtros de 0.2 µm y se colocaron en un baño de agua térmico a 50°C. Se realizó un muestreo de las distintas formulaciones en los días 0, 4, 10 y 15 para paramétros físicoquímicos. En la Tabla 7 se muestran los resultados de la medición de la pureza de monómero en los distintos días de muestreo.

Tabla 7. Valores de pureza de monómero normalizada de formulaciones de AcM hR3 a 150 mg/mL en estrés de 50°C durante 15 días.

Pureza de monómero de hR3 a 150 mg/mL y 50°C por SEC-HPLC (altura pico normalizada)			
Tiempo(días)	**hR3sol80conc**	**hR3sol82conc**	**hR3sol90conc**
0	100.00	100.00	100.00
4	45.34	58.99	Precipitado blanco
10	Gel amarillo	43.94	Precipitado blanco
15	Gel amarillo	Gel amarillo	Precipitado blanco

Como se observa en la Tabla 7 a los 4 días del estrés la variante hR3sol90 había precipitado completamente formando un sólido blanco mientras que la variante hR3sol80 tenía una pureza de monómero de 45.3% y la variante hR3sol82 una de 58.9%. Lo anterior nos indica que la formulación más estable en altas concentraciones es la hR3sol82 mientras que la menos estable es la hR3sol90. Este resultado coincide con los resultados obtenidos a baja concentración. A los 10 días de estrés la variante hR3sol80 forma un gel de color amarillo mientras que la variante hR3sol82 continua en solución con 43.9% de pureza de monómero. En el muestreo a los 15 días la variante hR3sol82 también forma un gel amarillo. Los resultados anteriores indican que la

formulación hR3sol82 que posee L-metionina en la composición es más estable en altas concentraciones que las variantes que carecen de este aminoácido. Estos resultados sugieren que a largo plazo las formulaciones más estables serán la hR3sol80 y la hR3sol82 a diferencia de la formulación hR3sol90.

La Tabla 8 muestra el porcentaje de monómero y dímeros de las muestras a 150 mg/mL sin estresar.

Tabla 8. Pureza de monómero de formulaciones de AcM hR3 a 150 mg/mL sin estrés.

Pureza de hR3 a 150 mg/mL en t0 por SEC-HPLC (%)			
Especies Moleculares	**hR3sol80conc**	**hR3sol82conc**	**hR3sol90conc**
Monómero	93.03	94.11	92.02
Dímero	6.30	5.29	7.17
Agregado	0.56	0.45	0.79
Fragmento	0.099	0.015	0.010

Aquí se nota que la formulación hR3sol82 es la de mayor porcentaje de monómero con 94.1% y la de menor dímero con 5,2% lo cual demuestra la tendencia de esta formulación a disminuir la asociación entre moléculas favoreciendo la estabilidad. Por su parte las variantes hR3sol80 y hR3sol90 tienen 93.0% y 92.0% de monómero respectivamente.

Se determinó además la actividad biológica de las formulaciones de AcM hR3 a 150 mg/mL antes de someterse al estrés de 50°C mediante citometría de flujo y por inhibición de la proliferación celular con la misma metodología empleada en el Ejemplo 3 para estas determinaciones. Estos resultados coinciden con los mostrados en la Tabla 5.

Ejemplo 5 Biodisponibilidad para el AcM nimotuzumab administrado por vía SC a distintas dosis en ratones Balb/c.

Partiendo de que se emplea el mismo Ac, la misma vía de administración y que los cambios en los componentes de la formulación no influyen de forma significativa en el comportamiento farmacocinético del Ac se realizó el estudio de biodispobibilidad con la variante de hR3sol90. Para realizar el mismo se tomaron ratones Balb/c hembras de aproximadamente 20 g de peso y se dividieron en 4 grupos a los que se les administró la formulación hR3sol90 por vía SC en dosis de 25, 50, 100 y 200 mg/kg de peso. El Ac antes de ser administrado se marcó con I^{125}. Luego se extrajo la sangre de cada individuo y se midió la actividad radiactiva la cual es proporcional a la concentración de Ac en sangre. En la Tabla 9 se muestran los valores de biodisponibilidad para las distintas dosis comparadas con una dosis IV de 25 mg/kg. Para el cálculo de la biodisponibilidad (F) se utiliza la siguiente fórmula:

F=(Asc/Aiv)*(Div/Dsc) donde:

Asc: área bajo la curva de la vía SC

Aiv: área bajo la curva de la vía IV

Div: dosis IV

Dsc: dosis SC

Para la via IV la biodisponibilidad se considera como 100%.

Tabla 9 Biodisponibilidad para el AcM nimotuzumab administrado por vía SC a distintas dosis.

Biodisponibilidad absoluta basada en el área bajo la curva de 0 a infinito para AcM nimotuzumab por vía SC				
Volumen administrado (mL)	**Masa total administrada (mg)**	**Dosis SC en mg/kg**	**Área bajo la curva de 0-∞ (µg/ml*h)**	**Biodisponibilidad (%)**
0.2	0.5	25	15153	83.7
0.2	1.0	50	30813	87.2
0.2	2.0	100	54264	78.7
0.2	4.0	200	124280	88.0
Dosis IV=25 mg/kg				

Los resultados que se muestran la Tabla 9 indican que en todos los casos la biodisponibilidad estuvo por encima de 75% lo cual es bueno para este tipo de vía de administración. Se debe observar que a pesar de que la biodisponibilidad prácticamente no aumenta con el aumento de la dosis, la masa total de Ac y el área bajo la curva si lo hacen. Por ejemplo, si estos resultados se extrapolan al humano para el caso de la dosis SC de 100 mg/kg, a pesar de que la biodisponibilidad es 78.7 %, la masa total de Ac que llegaría al torrente sanguineo sería 630 mg, más de tres veces el valor de 200 mg, que es la dosis que se utiliza en la clínica.

Ejemplo 6. Efecto antitumoral del AcM nimotuzumab administrado por vía IV y vía SC a dosis de 50 mg/kg en ratones Balb/c atímicos.

Ratones Balb/c atímicos hembras con aproximadamente 20 g de peso se dividieron en tres grupos de cinco animales cada uno. Todos los grupos recibieron $2x10^6$ células A431 el día cero y en los días 10, 12, 14 y 16 al Grupo 1 se le administró 1mg de masa total de la formulación hR3sol90 por vía SC, el Grupo 2 recibió 1 mg de masa total del AcM nimotuzumab por vía IV y el Grupo 3 fue el control y recibió solución de tampón fosfato salino.

La Figura 7 muestra como el volumen tumoral para los ratones que se les administró el nimotuzumab por vía SC fue semejante al de la vía IV. Esto demuestra que no hubo

diferencias en la eficacia del tratamiento por ambas vías a pesar de que la velocidad de absorción y características farmacocinéticas de cada vía es diferente. Por su parte el grupo control tuvo un crecimiento tumoral mucho mayor incluso con diferencias significativas. Esto indica la eficacia de la administración del AcM nimotuzumab por vía SC.

Ejemplo 7. Pureza del AcM nimotuzumab liofilizado a 150 mg/mL.

Las formulaciones hR3sol80, hR3sol82 y hR3sol90 se liofilizaron a 150 mg/mL y un volumen de 500 µL. Para esto se empleó una liofilizadora de laboratorio a una temperatura de -30°C y se hizo vacío durante 30 horas hasta quedar un polvo de color blanco. Luego se reconstituyó con 500µl de agua ultrapura hasta la concentración inicial quedando una solución transparente y libre de partículas.

En la Tabla 10 se presentan los datos de pureza de las distintas formulaciones del AcM nimotuzumab después de ser liofilizadas y luego reconstituidas.

Tabla 10. Pureza del AcM nimotuzumab liofilizado y reconstituido a 150 mg/mL.

Pureza del AcM nimotuzumab después de liofilizar y reconstituir a 150 mg/mL			
Muestras	**Monómero (%)**	**Dímero (%)**	**Monómero +Dímero (%)**
hR3sol80	94.18	5.73	99.91
hR3sol82	98.8	1.17	99.97
hR3sol90	93.65	5.89	99.54

Se puede observar que después de liofilizada y reconstituida la formulación hR3sol82 tuvo una pureza de monómero de más de 98% mientras que la variante hR3sol80 tuvo alrededor de 94% y la variante hR3sol90 mas de 93%. Además debe notarse como el porcentaje de dímeros cambia en dependencia del tipo de formulación. Adicionalmente, en la Tabla se muestra la pureza total de monómero más dímero de estas formulaciones liofilizadas y reconstituidas que en todos los casos estuvo por encima de 99%, lo cual indica que el AcM nimotuzumab no pierde su estabilidad a pesar del estrés durante el proceso de liofilización. Se debe entender también que el Ac nimotuzumab posee un equilibrio entre monómero y dímero debido a las características propias de este Ac, el cual puede variar en dependencia del tipo de interacciones en la solución.