

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 354**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06788180 .5**
96 Fecha de presentación: **20.07.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1912667**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.04.2008**

54 Título: **Liofilizados de proteínas concentrados, procedimientos y usos**

30 Prioridad:
22.07.2005 US 702025 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.11.2012

73 Titular/es:
AMGEN, INC (100.0%)
PATENT OPERATIONS, M/S 28-2-C ONE AMGEN
CENTER DRIVE
THOUSAND OAKS, CA 91320-1799, US

72 Inventor/es:
KRISHNAN, SAMPATHKUMAR;
PALLITTO, MONICA;
NAGLE, SAMANTHA;
CRAMPTON, SHON LEE;
RICCI, MARGARET SPEED;
CAO, WENJIN;
LIN, HONG y
XIE, YONG

74 Agente/Representante:
UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 390 354 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Liofilizados de proteínas concentrados, procedimientos y usos

5 Referencia a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica beneficio sobre la solicitud provisional de EE.UU. número de serie 60/702,025 presentada el 22 de julio de 2005.

10 Campo de la invención

La invención se refiere a, entre otras cosas, liofilizados de elevada área de superficie que comprende al menos una proteína y que se reconstituyen rápidamente tras la adición de diluyente para proporcionar soluciones de concentraciones elevadas de proteínas, con poca formación de espuma, efervescencia, burbujas, agregados y partículas, entre otras. Entre las composiciones preferidas y procedimientos para fabricar las mismas, se encuentran las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a pacientes humanos para el tratamiento de enfermedades.

20 Antecedentes de la invención

Actualmente, los procedimientos de ADN recombinante desarrollados desde finales de la década de 1970 se usan como los principales medios para producir proteínas farmacéuticas para uso humano y veterinario. Aunque los procedimientos recombinantes han superado a muchos, si no la mayoría, de los retos de producir estas proteínas, sigue habiendo problemas que superar sobre su formulación y administración.

En general, las proteínas se degradan completamente mediante procesos digestivos y, como norma, no se pueden administrar por vía oral. Asimismo, en general son demasiado grandes para la administración transdérmica. Adicionalmente, aunque se pueden preparar muchas proteínas como formulaciones líquidas, algunas a una concentración bastante elevada, son propensas, en el estado líquido, a la degradación física y/o química. En concreto, la agregación es habitual en formulaciones de proteínas líquidas a concentraciones elevadas. Las formulaciones liofilizadas suelen ser mucho más estables. No sufren la degradación o agregación que se produce en las formulaciones líquidas. O, si lo hacen, la degradación o pérdida de la actividad proteica se produce a una velocidad mucho más lenta. No obstante, ha sido difícil o no posible producir liofilizados estables de muchas proteínas terapéuticas que se pueden reconstituir en las concentraciones necesarias para eficacia terapéutica.

Los problemas asociados con la formulación de terapéuticas proteicas son especialmente exigentes cuando se desean concentraciones elevadas como, por ejemplo, en las formulaciones para administración subcutánea. De hecho, muchas proteínas no se pueden formular de forma estable en solución como concentraciones elevadas. E, incluso cuando se pueden formular las proteínas, al menos inicialmente a concentraciones elevadas, las formulaciones a menudo sufren diversas características indeseables, tales como escasa vida de almacenamiento, una reconstitución mala o poco fiable y turbidez, espumas o burbujas inaceptables tras la reconstitución. Como resultado, muchas terapéuticas proteicas que podrían administrarse de forma ventajosa por vía subcutánea tienen que administrarse por vía intravenosa en su lugar. Dichos problemas no solo son característicos de las proteínas formuladas completamente en forma líquida sino también de las proteínas que han sido liofilizadas y después deben reconstituirse en una forma líquida para administración.

Claramente existe una necesidad de procedimientos para producir y formular agentes terapéuticos proteicos como liofilizados estables. En concreto existe la necesidad de liofilizados que se pueden reconstituir para proporcionar formulaciones de concentración elevada. Y, a este respecto, existe la necesidad de liofilizados que se puedan reconstituir para proporcionar formulaciones de concentración proteica elevada para inyección SC. Uno de los principales obstáculos para alcanzar dichas formulaciones es producir una composición purificada estable que se puede reconstituir en el punto de atención en las concentraciones proteicas elevadas necesarias para una dosificación eficaz mediante administración SC.

Los obstáculos para obtener dichas formulaciones incluyen: (i) inestabilidad proteica incontrolada e impredecible durante el procesamiento y almacenamiento, y pérdida de actividad causada de este modo; (ii) tiempos de reconstitución excesivamente prolongados; (iii) formación impredecible e incontrolada de agregados que afectan de forma perjudicial a la actividad o tienen como resultado una turbidez inaceptable; (iv) formación de espuma al reconstituir que disminuye la actividad de la unidad o que es estéticamente inaceptable para los usuarios; (v) formación de burbujas y efervescencia que produce desnaturalización y disminuye la actividad o son inaceptables para los usuarios; (v) atrapamiento de burbujas que interfieren en la dosificación adecuada; (vii) partículas residuales que reducen la recuperación y dosificación y/o que son inaceptables para los usuarios; (viii) viscosidad elevada que dificulta cargar adecuadamente las jeringas para administración; y (ix) otras alteraciones perjudiciales incontrolables en la bioactividad, biodisponibilidad, fiabilidad de la dosificación o aceptabilidad de la dosificación, que es el resultado de, procedimiento de formulación y reconstitución.

Shire y col. han revisado las oportunidades y retos de las formulaciones proteicas de concentración elevada en su artículo de revisión "Challenges in the Development of High Protein Concentration Formulations," J. Pharm. Sci. 93(6): 1390-1402 (June 2004). Varios trabajadores han descrito enfoques para mejorar las formulaciones proteicas altamente concentradas. Roser, en la patente de EE.UU. N° 4.891,319, describe el uso de 0,05 y 25 por ciento en peso de trehalosa para proteger las proteínas contra la desnaturalización durante la desecación. Aunque la trehalosa reduce la pérdida de actividad en algunos regímenes de desecación, no resuelve muchos otros de los problemas mencionados con anterioridad. Andya y col., en la patente de EE.UU. N° 6.685.940, describen un liofilizado de anticuerpos preparado con un azúcar no reductor e histidina y una proporción molar del anticuerpo/azúcar de 100 a 600. Según se ha informado, el liofilizado podría reconstituirse en una solución isotónica que contiene de 50 a 400 mg/ml de anticuerpo. El proceso de Andya requiere solo una etapa de desecación y es posible que a menudo produzca resultados no satisfactorios. Aunque se ha demostrado que esto es aparentemente eficaz para algunos anticuerpos, no se ha probado que en general sea aplicable y no supera todos los problemas mencionados con anterioridad.

Rapp y Grandgeorge, en la publicación de solicitud de EE.UU. N° 2004/0005310 A1, describen procedimientos para reconstituir proteínas liofilizadas a presión de gas entre 1 mbar y la presión atmosférica, que son particularmente adecuados para las proteínas de la coagulación de la sangre. Los procedimientos parecen hacer avanzar la técnica ligeramente para algunas proteínas. En concreto, la innovación no parece ser ampliamente aplicable y probablemente no sea adecuada para la autoadministración por el paciente.

El documento US 6.821.515 describe una formulación de proteínas liofilizadas que se puede reconstituir con un diluyente adecuado para generar una formulación reconstituida con concentración proteica elevada. En concreto, la formulación proteica es para usar en un procedimiento de tratar el cáncer y comprende un anticuerpo que se une a HER2.

Por tanto, a pesar de estas y otras mejoras, sigue existiendo la necesidad de procedimientos mejorados para preparar y formula proteínas altamente concentradas y para preparaciones proteicas de concentración elevada que tienen una vida de almacenamiento larga, son estables en condiciones relativamente desfavorables (que se pueden encontrar durante el envío, almacenamiento y uso), se pueden reconstituir de forma fiable y administrar de modo conveniente en forma y manera completamente aceptables a una amplia diversidad de usuarios. En concreto, existe la necesidad de procedimientos fiables para formular las terapéuticas proteicas de un modo que conserven la actividad, proporcionen una estabilidad adecuada para permitir el almacenamiento a largo plazo y que proporcionen una formulación fiable en el punto de atención para formulaciones proteicas de concentración elevada adecuadas para administración subcutánea.

Resumen

La presente invención se refiere a un liofilizado que comprende una proteína y manitol, en el que el manitol está compuesto por al menos 70 % de delta manitol, no más de 20 % de manitol hidratado y no más de 10 % de manitol amorfo, en el que el área de superficie del liofilizado es igual o superior a 1,2 m²/g. El manitol puede estar compuesto por al menos 70 % de delta manitol, no más de 10 % de manitol amorfo y no más de 20 % de manitol hidratado más alfa manitol más beta manitol. El liofilizado puede comprender además sacarosa. EL liofilizado puede además comprender un tensioactivo o uno o más de un agente espesante, un agente estabilizante y un lioprotector. La proteína puede ser un anticuerpo, o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma, y el anticuerpo puede ser humano o humanizado, o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo. La proteína puede ser una región de un anticuerpo humano o humanizado, o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo. Dicha región puede ser una región Fc, o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma. La proteína puede ser un peptidocuerpo o puede ser una proteína de fusión que comprende una región Fc y un resto de unión a TNF, o un resto de unión a TNF alfa, un resto de unión a IL-1 o un resto de unión al receptor de IL-1, un resto de unión al receptor de IL-1 de la proteína IL-1 ra humana. La proteína puede ser Fc-IL-1 ra.

Por tanto, está entre los objetos de la presente invención proporcionar en ciertos de sus aspectos preferidos y realizaciones referidas cada uno y todos los siguientes. Los párrafos numerados siguientes son autorreferencias. En concreto, la frase "de acuerdo con cualquiera de los anteriores o los siguientes" usada en estos párrafos se refiere a los otros párrafos en el Resumen. La frase también significa en los párrafos siguientes que la invención abarca, en varias realizaciones, no solo la materia objeto descrita en los párrafos individuales sino también la materia objeto descrita por los párrafos tomados en combinación. A este respecto, es explícitamente el propósito del solicitante al establecer los párrafos siguientes describir varios aspectos y realizaciones de la invención, particularmente mediante los párrafos tomados en combinación. De un modo similar, varios aspectos y realizaciones de la invención se refieren a entradas específicas en listas de valores proporcionadas en los siguientes párrafos, que se citan en formato de lista en lugar de únicamente individualmente a efectos de brevedad. El liofilizado, en ciertas realizaciones, un liofilizado farmacéutico puede tener una o más de las características siguientes expuestas en los párrafos siguientes, tomando los párrafos solos o en cualquier combinación, e incluyendo uno o más (si alguno) de los valores indicados a continuación:

ES 2 390 354 T3

En un plazo de cualquiera de 1 o menos, 2 o menos, 3 o menos, 4 o menos o 5 o menos minutos después de añadir un diluyente al liofilizado se forma una solución, estando dicha solución caracterizada por uno cualquiera o más de los siguientes, tomados en combinación:

- 5 (a) el liofilizado es cualquiera de al menos 90, 92, 95, 97, 98, o 99 % +/- 0 o +/- 1 0 % disuelto en el mismo;
(b) la concentración de la proteína en la solución es cualquiera de al menos 25, 30, 35, 40, 50, 55, 65, 75, 85, 90, 95, 100, 110, 115, 120, 125, 130, 140, 150, 160, 175, 200, 225, 250, o 300 mg/ml;
(c) la altura de la espuma encima de la solución es menos que cualquiera de 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, o 35 % de la altura de la espuma encima de la solución más la altura de la solución;
10 (d) en la solución hay uno cualquiera o más de: ausencia de efervescencia visible, ausencia de turbidez visible, ausencia de burbujas visibles y/o ausencia de partículas visibles;

- la altura de la espuma se mide bajo iluminación uniforme con una intensidad en la muestra de aproximadamente 2.000 lux usando fondos negro y blanco sin brillo, y las alturas se miden usando compases;
- 15 la composición se agita suavemente durante o hasta tres minutos tras la adición del diluyente;
la presencia de uno cualquiera o más de: efervescencia visible, turbidez visible, burbujas visibles y/o partículas visibles se determina mediante observación bajo iluminación uniforme que tiene una intensidad en la muestra de aproximadamente 2.000 lux usando fondos negros y blancos sin brillo;
que tiene un área de superficie que es igual o mayor que cualquiera de 1,2, 1,3 o 1,4 m²/g;
20 que tiene un área de superficie que es igual o mayor que cualquiera de 1,2, 1,3 o 1,4 m²/g;
y en ciertas realizaciones concretas mayor que 1,2 m²/g;
que tiene un área de superficie que es igual o mayor que cualquiera de 1,2, 1,3 o 1,4 m²/g e igual o menor que cualquiera de 1,5, 1,7, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, o 5,0 m²/g;
que tiene un área de superficie que es igual o mayor que cualquiera de 2, 1,3 o 1,4 m²/g e igual o menor que
25 cualquiera de 1,5, 1,7, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, o 5,0 m²/g;
que tiene un área de superficie que es igual o mayor que 1,2 m²/g;
El manitol en la misma es igual o mayor que aproximadamente 70 % de delta manitol, igual o menor que aproximadamente 10 % de manitol amorfo, y la suma de manitol hidratado, alfa manitol y beta manitol es igual o menor que aproximadamente 20 %;
- 30 el manitol en la misma es igual o mayor que 70 % de delta manitol, igual o menor que 10 % de manitol amorfo, y la suma de manitol hidratado, alfa manitol y beta manitol es igual o menor que 20 %;
la adición de diluyente tiene como resultado una solución con una concentración proteica de al menos aproximadamente 40, 45, 50, 60 75, 90, 100, o 150 mg/ml;
la adición de diluyente tiene como resultado una solución con una concentración proteica de al menos
35 aproximadamente 40, 45, 50, 60 75, 90, 100 o 150 mg/ml;
la adición de diluyente tiene como resultado una solución con una concentración proteica de aproximadamente 40 a 250, 40 a 200, 75 a 150, o 50 a 100 mg/ml;
la adición de diluyente tiene como resultado una solución con una concentración proteica de 40 a 250, 40 a 200, 75 a 150, o 50 a 100 mg/ml;
- 40 la proteína tiene una estabilidad de aproximadamente cualquiera de 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % durante al menos cualquiera de aproximadamente 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, o 24 meses de almacenamiento a cualquiera de aproximadamente 4, 21 o 37 °C, incluida cualquier combinación de los porcentajes, meses de almacenamiento y temperaturas de almacenamiento anteriores.
el porcentaje de estabilidad se determina respecto a la cantidad de proteína intacta en el liofilizado cuando se inicia
45 el almacenamiento;
la proteína tiene una estabilidad de al menos cualquiera de 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % durante al menos cualquiera de 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, o 24 meses de almacenamiento a cualquiera de 4, 21 o 37 °C, incluida cualquier combinación de los porcentajes, meses de almacenamiento y temperaturas de almacenamiento anteriores.
la estabilidad se mide mediante la proporción de la(s) cantidad(es) de uno o más "pico(s) nativo(s)" representativos
50 de la proteína intacta con la cantidad total de proteína presente (como indican los picos nativos más todos los demás picos de la proteína);
en la que la estabilidad se mide mediante SE-HPLC;
la solución fluye fácilmente;
- la solución resultante tiene una viscosidad lo bastante baja como para fluir con eficiencia a través de la aguja hipodérmica de un calibre efectivo para inyección subcutánea en un sujeto humano;
- 55 la viscosidad de la solución resultante es una cualquiera por debajo de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, o 100 cP, en realizaciones concretas por debajo de 50 cP, en realizaciones concretas por debajo de 25 cP, en varias realizaciones concretas por debajo de 10 cP;
el diluyente se desgasifica antes de la adición al liofilizado;
- 60 que comprende al menos uno de uno cualquiera o más de los siguientes: un agente espesante, un agente estabilizante, un lioprotector y/o un tensioactivo;
que comprende cualquiera de 2,0, 2,5, 3,0. 3.5, o 4,0 % de manitol;
que comprende de 2,0 a 4,0 % de manitol;
que comprende sacarosa;
- 65 que comprende 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, o 2,5 % de sacarosa;
que comprende de 1,0 a 2,0 % de sacarosa;

- que comprende un tensioactivo;
 que comprende uno o más de un polisorbato y Pluronic F68
 que comprende un polisorbato 80 o un polisorbato 20 en una concentración de 0,004 % a 0,15 % y/o Pluronic F68 en una concentración de 0,05 % a 1,5 %;
- 5 en la que la proteína es un agente para uso terapéutico humano o para uso veterinario o para ambos;
 en la que la proteína es un agente para uso terapéutico humano o para uso veterinario o para ambos, y el liofilizado es adecuado para uso terapéutico humano o para uso veterinario o para ambos;
 la proteína es un agente farmacéutico para uso terapéutico humano y el liofilizado es adecuado para uso terapéutico humano;
- 10 la solución es adecuada para administración subcutánea a un sujeto humano;
 la composición está dispuesta en un contenedor estéril al vacío, el diluyente es estéril y desgasificado y la solución resultante es estéril, es adecuada para la administración a un sujeto humano mediante inyección subcutánea y tiene una viscosidad suficientemente baja como para fluir con eficiencia a través de una aguja hipodérmica de un calibre efectivo para inyección subcutánea en sujetos humanos;
- 15 la composición está dispuesta en un contenedor estéril al vacío, el diluyente es estéril y desgasificado y la solución resultante es estéril, es adecuada para la administración a un sujeto humano mediante inyección subcutánea y la viscosidad de la solución resultante está por debajo de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, o 100 cP, en realizaciones concretas por debajo de 50 cP, en realizaciones concretas por debajo de 25 cP, en varias realizaciones por debajo de 10 cP;
- 20 la composición está dispuesta en un contenedor estéril al vacío, el diluyente es estéril y desgasificado y la solución resultante
 la solución es estéril, es adecuada para la administración a un sujeto humano mediante inyección subcutánea y tiene una viscosidad lo bastante baja como para fluir con eficiencia a través de la aguja hipodérmica de un calibre efectivo para inyección subcutánea en un sujeto humano;
- 25 la adición del diluyente tiene como resultado una solución que comprende la proteína a aproximadamente 40 a 150 mg/ml, histidina de aproximadamente 7 a 50 mM, aproximadamente de 2 % a 4 % de manitol, aproximadamente de 1,0 a 2,5 % de sacarosa y aproximadamente de 0,004 % a 0,015 % de polisorbato 20 o polisorbato 80, con un pH de 4,5 a 7,5;
 la adición del diluyente tiene como resultado una solución que comprende la proteína a aproximadamente 40 a 150 mg/ml, en histidina aproximadamente 20 mM, aproximadamente 3,3 % de manitol, aproximadamente 2 % de sacarosa y aproximadamente 0,01 % de polisorbato 20 o polisorbato 80, a un pH de aproximadamente 5,0;
- 30 la adición del diluyente tiene como resultado una solución que comprende la proteína a aproximadamente 40 a 150 mg/ml, histidina de aproximadamente 10 a 20 mM, aproximadamente de 2,0 % a 4,2 % de manitol, aproximadamente de 0,5 a 2,5 % de sacarosa y aproximadamente de 0,004 % a 0,015 % de polisorbato 20 o polisorbato 80, con un pH de 4,5 a 7,6;
- 35 la adición del diluyente tiene como resultado una solución que comprende la proteína a aproximadamente 40 a 60 mg/ml, Tris de aproximadamente 10 mM, aproximadamente 4 % de manitol, aproximadamente 2 % de sacarosa, aproximadamente 0,004 % de polisorbato 20 o polisorbato 80, a un pH de aproximadamente 7,4;
 la proteína puede ser una región de un anticuerpo, o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma.
- 40 la proteína comprende una región de un anticuerpo;
 la proteína es un anticuerpo humano, o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo;
 la proteína comprende una región de un anticuerpo humano;
 la proteína puede ser una región de un anticuerpo de tipo IgG humana, o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma.
- 45 la proteína comprende un resto efector de un anticuerpo, o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma.
 la proteína comprende un resto efector de una región Fc de un anticuerpo, o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo.
- 50 la proteína es cualquiera de un anticuerpo de tipo IgA, IgD, IgE, IgG, o IgM, o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo;
 la proteína puede ser una región de un anticuerpo de tipo IgG humana, o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma.
 la proteína puede ser una región de un anticuerpo de tipo IgG humana, o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma.
- 55 la proteína es cualquiera de un anticuerpo de tipo IgG 1, IgG2, IgG3, o IgG4, o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo;
 la proteína es un anticuerpo de tipo IgG, o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo;
 la proteína es un anticuerpo de tipo IgG1, o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo;
 la proteína es cualquiera de un anticuerpo de tipo IgA1 o IgA2, o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo;
- 60 la proteína es un anticuerpo monocatenario, o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo;
 la proteína es un anticuerpo quimérico, o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo;
 la proteína es un anticuerpo humanizado, o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo;
 el anticuerpo es un anticuerpo humano, o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo;
- 65 la proteína es un peptidocuerpo;
 la proteína comprende un resto efector de un anticuerpo, o una variante, derivado, fragmento o mimético de la

misma.

la proteína comprende un fragmento de una región Fc de un anticuerpo, o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo;

la proteína comprende una región Fc de un anticuerpo, o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma.

5 la proteína comprende la región Fc de un anticuerpo; la proteína es una proteína de fusión;

la proteína es una proteína de fusión que comprende un resto efector de un anticuerpo o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma.

la proteína es una proteína de fusión que comprende un fragmento de una región Fc de un anticuerpo, o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo;

10 la proteína es una proteína de fusión que comprende la región Fc de un anticuerpo o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma.

la proteína es una proteína de fusión que comprende la región Fc de un anticuerpo; la solución resultante comprende la proteína de fusión a aproximadamente 40 a 60 mg/ml, un agente tampón, aproximadamente 4,0 % de manitol y aproximadamente 2 % de sacarosa, a aproximadamente 6,8 a 7,6;

15 la solución resultante comprende la proteína de fusión Fc a aproximadamente 50 mg/ml, Tris aproximadamente 10 mM a 20 mM, aproximadamente 4,0 % de manitol y aproximadamente 2 % de sacarosa, a un pH de aproximadamente 7,2 a 7,6;

la solución resultante comprende la proteína de fusión Fc a aproximadamente 50 mg/ml, Tris aproximadamente 10 mM a 20 mM, aproximadamente 4,0 % de manitol, aproximadamente 2 % de sacarosa, y aproximadamente 0,004 % de polisorbato, a un pH de aproximadamente 7,4;

20 la proteína es una proteína de fusión que comprende cualquiera o ambos de un resto efector de un anticuerpo o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma, y un resto de unión a ligando de una proteína de unión a ligando, o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma;

la proteína es una proteína de fusión que comprende una región Fc de un anticuerpo o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma, y un resto de unión a TNF de un receptor de TNF, o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma;

25 la proteína es una proteína de fusión que comprende una región Fc de un anticuerpo humano o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma, y un resto de unión a TNF de un receptor de TNF alfa humano, o una variante, derivado, fragmento o mimético de un receptor de TNF alfa humano;

30 la proteína es una proteína de fusión que comprende un resto efector de un anticuerpo o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma, y un resto de unión de un ligando proteico, o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma;

la proteína es una proteína de fusión que comprende una región Fc de un anticuerpo o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma, y un resto de unión a IL-1 de un ligando proteico de un receptor de IL-1, o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma;

35 la proteína es una proteína de fusión que comprende una región Fc de un anticuerpo humano o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma, y el resto de unión al receptor de IL-1 de un ligando proteico del receptor de IL-1;

40 la proteína es una proteína de fusión que comprende una región Fc de un anticuerpo humano o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma, y el resto de unión al receptor de IL-1 de un antagonista del receptor de IL-1;

la proteína es una proteína de fusión que comprende una región Fc de un anticuerpo humano o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma, y el resto de unión al receptor de IL-1 del antagonista de la proteína IL-1ra humana del receptor de IL-1;

45 la proteína es Fc-IL-1 ra, y en la que en tres minutos o menos tras la adición de un diluyente a dicho liofilizado: (a) el liofilizado está al menos 90 % +/-10 % disuelto;

(b) la altura de la espuma encima de la solución resultante es menos que cualquiera de 35 % de la altura de la espuma encima de la solución más la altura de la solución;

(c) no hay efervescencia visible en la solución;

50 y (d) la solución resultante contiene Fc-IL-1 ra a una concentración de 40 a 150 mg/ml en histidina de aproximadamente 7 a 50 mM, aproximadamente de 2 % a 4 % de manitol, aproximadamente de 1,0 a 2,5 % de sacarosa y aproximadamente de 0,004 % a 0,015 % de polisorbato 20 o polisorbato 80, con un pH de 4,5 a 7,5;

la adición del diluyente tiene como resultado una solución que comprende Fc-IL-1 ra a aproximadamente 75 a 125 mg/ml, en histidina aproximadamente 20 mM, aproximadamente 3,3 % de manitol, aproximadamente 2 % de sacarosa y aproximadamente 0,01 % de polisorbato 20 o polisorbato 80, a un pH de aproximadamente 5,0;

55 También se describe un procedimiento para producir una composición proteica liofilizada, en ciertas realizaciones un liofilizado farmacéutico de acuerdo con cualquiera de los anteriores o con los siguientes y que tiene una o más de las características siguientes: que comprende:

60 (a) hibridar una composición que comprende una proteína a presión reducida a una primera temperatura de hibridación;

(b) desecar la composición hibridada a presión más reducida a una primera temperatura de desecación durante un tiempo eficaz para reducir el contenido en humedad al 75 % o menos; y

65 (c) desecar más la composición a la temperatura más reducida a una segunda temperatura de desecación durante un tiempo eficaz para reducir el contenido en humedad de la composición a menos del 3,5 %, de modo

que se produce la composición proteica liofilizada;

que comprende:

- 5 (a) aplicar un vacío a una composición que comprende agua, una proteína y un lioprotector o agente espesante;
 (b) enfriar la composición a vacío parcial a o por debajo de una primera temperatura reducida;
 (c) mantener la composición a vacío parcial a o por debajo de la primera temperatura reducida hasta que esté completamente congelada;
 (d) elevar la temperatura de la composición a vacío parcial hasta una temperatura de hibridación;
- 10 (e) mantener la composición a la temperatura de hibridación a vacío parcial durante un tiempo eficaz para la cristalización programada de más del 60 % del agente espesante en la composición;
 (f) enfriar la composición a vacío parcial hasta una segunda temperatura reducida, manteniendo la composición a una temperatura por debajo de la temperatura de transición vítrea durante todo el proceso de enfriamiento;
 (g) mantener la composición a la segunda temperatura reducida;
- 15 (h) elevar la temperatura de la composición al vacío hasta una primera temperatura de desecación inferior a la temperatura de transición vítrea, manteniendo la composición a una temperatura por debajo de la temperatura de transición vítrea durante todo el proceso de calentamiento;
 (i) mantener la composición al vacío a la primera temperatura de desecación y por debajo de la temperatura de transición vítrea hasta que el contenido en agua de la composición es inferior al 10 % o menor;
- 20 (h) elevar la temperatura de la composición al vacío hasta una segunda temperatura de desecación manteniendo la composición a una temperatura por debajo de la temperatura de transición vítrea durante todo el proceso de calentamiento;
 (k) mantener la composición a la segunda temperatura de desecación hasta que el contenido en agua de la composición es del 3 % o menor, manteniendo la composición a una temperatura por debajo de la temperatura de transición vítrea durante todo el proceso, de modo que se produce el liofilizado;
- 25

que comprende:

- 30 (a) reducir la temperatura de una composición que comprende una proteína y un agente espesante hasta una primera temperatura mínima de -40 °C o menor;
 (b) elevar la temperatura de la composición a vacío parcial hasta una temperatura de hibridación entre -25 °C y 0 °C;
 (c) conservar la composición a la temperatura de hibridación;
- 35 (d) reducir la temperatura de la composición hasta una segunda temperatura mínima de -40 °C o menor;
 (e) elevar la temperatura de la composición a vacío parcial hasta una primera temperatura de desecación de o superior a -10 °C;
 (f) conservar la composición a la primera temperatura de desecación;
 (g) elevar la temperatura de la composición hasta una segunda temperatura de desecación;
- 40 (h) conservar la composición a la segunda temperatura de desecación hasta que la composición está seca, de modo que se produce el liofilizado;

que comprende:

- 45 (a) reducir la temperatura del liofilizado que comprende una proteína y un agente espesante hasta una primera temperatura mínima de -40 °C o menor;
 (b) elevar la temperatura de la composición a vacío parcial hasta una temperatura de hibridación entre -25 °C y 0 °C;
 (c) conservar la composición a la temperatura de hibridación durante una hora o más;
- 50 (d) reducir la temperatura de la composición hasta una segunda temperatura mínima de -40 °C o menor;
 (e) elevar la temperatura de la composición hasta una primera temperatura de desecación de o superior a -10 °C;
 (f) conservar la composición a la primera temperatura de desecación durante cinco horas o más;
- 55 (g) elevar la temperatura de la composición hasta una segunda temperatura de desecación;
 (h) conservar la composición a la segunda temperatura de desecación durante dos horas o más hasta que la composición está seca, de modo que se produce el liofilizado proteico;

que comprende:

- 60 (a) reducir la temperatura del liofilizado que comprende una proteína y un agente espesante a entre 0,05 y 1,0 °C por minuto hasta una primera temperatura mínima de -40 °C o menor;
 (b) elevar la temperatura de la composición a vacío parcial hasta una temperatura de hibridación entre -25 °C y 0 °C;
 (c) conservar la composición a la temperatura de hibridación durante más de 1 hora;
- 65 (d) reducir la temperatura de la composición a una velocidad entre 0,05 y 1,0 °C por minuto hasta una segunda temperatura mínima de -40 °C o menor;
 (e) elevar la temperatura de la composición a una velocidad entre 0,05 y 1,0 °C por minuto hasta una primera

temperatura de desecación de -10 °C o mayor;

(f) conservar la composición a la primera temperatura de desecación durante cinco horas o más;

(g) elevar la temperatura de la composición a una velocidad entre 0,05 y 1,0 °C por minuto hasta una segunda temperatura de desecación;

5 (h) conservar la composición a la segunda temperatura de desecación durante al menos dos horas o más hasta que la composición está seca, de modo que se produce el liofilizado proteico;

la composición para liofilización se desgasifica antes de la etapa de congelación inicial;

10 la composición para liofilización se enfría hasta 5 °C y se mantiene a dicha temperatura hasta que está completamente equilibrada antes de la etapa de congelación inicial;

el liofilizado resultante es un liofilizado que comprende una proteína de acuerdo con cualquiera de los anteriores;

También se describe un procedimiento para producir una composición liofilizada que comprende Fc-IL-1-ra, en ciertas realizaciones, un liofilizado farmacéutico que comprende Fc-IL-1-ra de acuerdo con cualquiera de los anteriores o siguientes, y puede tener cualquiera de las características siguientes:

15 anteriores o siguientes, y puede tener cualquiera de las características siguientes:

que comprende:

20 (a) formular una solución que comprende Fc-IL-1-ra, un agente tampón, un agente espesante y un protector y, después, equilibrar la formulación hasta una temperatura por encima de cinco grados por encima del punto de congelación;

(b) enfriar la composición a vacío parcial hasta una primera temperatura de congelación a o entre -60 y -40 °C;

(c) mantener la composición a vacío parcial a o por debajo de la primera temperatura reducida hasta que esté completamente congelada;

25 (d) elevar la temperatura de la composición a vacío parcial hasta una temperatura de hibridación a o entre -10 a -15 °C;

(e) mantener la composición a la temperatura de hibridación a vacío parcial durante un tiempo eficaz para la cristalización programada de más del 90 % +/-10 % el agente espesante en la composición;

(f) enfriar la composición a vacío parcial hasta una segunda temperatura reducida a o entre -40 y -40 °C;

30 (g) mantener la composición a la segunda temperatura reducida a vacío parcial y, después, llevarlo a vacío completo;

(h) elevar la temperatura de la composición al vacío hasta una primera temperatura de desecación manteniendo la composición a una temperatura por debajo de la temperatura de transición vítrea durante todo el proceso de calentamiento;

35 (i) mantener la composición al vacío a la primera temperatura de desecación siempre por debajo de la temperatura de transición vítrea hasta que el contenido en agua de la composición es inferior al 10 % o menor;

(j) elevar la temperatura de la composición al vacío hasta una segunda temperatura de desecación manteniendo la composición a una temperatura por debajo de la temperatura de transición vítrea durante todo el proceso de calentamiento;

40 (k) mantener la composición a la segunda temperatura de desecación hasta que el contenido en agua de la composición es del 2 % o menor, manteniendo la composición a una temperatura por debajo de la temperatura de transición vítrea durante todo el proceso, de modo que se produce el liofilizado;

45 la formulación para liofilización contiene aproximadamente 3,3 % de manitol y aproximadamente 2 % de sacarosa y tiene un pH de aproximadamente 5,0;

la formulación para liofilización contiene Fc-IL-1-ra a una concentración de aproximadamente 100 mg/ml;

que comprende una proteína de fusión Fc, que comprende:

50 (a) formular un liofilizado que comprende una proteína de fusión Fc, un agente tampón, un agente espesante y un protector en solución, desgasificar la composición y, después, equilibrar la composición hasta una temperatura de aproximadamente cinco grados por encima del punto de congelación;

(b) enfriar la composición a vacío parcial por encima de 250 mTorr hasta una primera temperatura de congelación a o entre -60 y -40 °C;

55 (c) mantener la composición a vacío parcial a o por debajo de la primera temperatura reducida hasta que esté completamente congelada;

(d) elevar la temperatura de la composición a vacío parcial hasta una temperatura a o entre -10 a -15 °C;

(e) mantener la composición a la temperatura en (d) a vacío parcial durante un tiempo eficaz para la cristalización de más del 60 % del agente espesante en la composición;

(f) enfriar la composición a vacío parcial hasta una segunda temperatura reducida a o entre -40 y -40 °C;

60 (g) mantener la composición a la segunda temperatura reducida a vacío parcial durante un periodo de tiempo;

(h) a un vacío inferior a 250 mTorr, elevar la temperatura de la composición hasta una primera temperatura de desecación manteniendo la composición a una temperatura por debajo de la temperatura de transición vítrea durante todo el proceso de calentamiento;

65 (i) mantener la composición al vacío a la primera temperatura de desecación siempre por debajo de la temperatura de transición vítrea hasta que el contenido en agua de la composición es inferior al 10 % o menor;

(j) elevar la temperatura de la composición al vacío hasta una segunda temperatura de desecación manteniendo

ES 2 390 354 T3

la composición a una temperatura por debajo de la temperatura de transición vítrea durante todo el proceso de calentamiento;

- 5 (k) mantener la composición a la segunda temperatura de desecación hasta que el contenido en agua de la composición es del 3 % o menor, manteniendo la composición a una temperatura por debajo de la temperatura de transición vítrea durante todo el proceso de modo que se produce el liofilizado;

la composición para liofilización comprende aproximadamente de 3,3 % a 4,2 % de manitol y aproximadamente de 1,5 % a 2,5 % de sacarosa;

- 10 la composición para liofilización comprende la proteína de fusión Fc a una concentración de aproximadamente 40 a 60 mg/ml;

la composición para liofilización comprende aproximadamente 4,0 % de manitol y aproximadamente de 2 % de sacarosa;

- 15 la composición comprende Tris y un pH de aproximadamente 7,2 a 7,6; la composición comprende Tris a aproximadamente 10 mM a 20 mM y tiene un pH de aproximadamente 7,4;

el liofilizado comprende la proteína de fusión Fc a una concentración de aproximadamente 50 mg/ml; el liofilizado comprende una proteína de acuerdo con cualquiera de los liofilizados anteriores o siguientes;

que comprende:

- 20 (a) equilibrar una muestra de aproximadamente 100 mg/ml de la proteína hasta aproximadamente 4° C;
(b) enfriar la muestra hasta aproximadamente -50 °C a aproximadamente -0,5 °C/min y, después, conservar la muestra a aproximadamente -50 °C durante aproximadamente 120 minutos;
(c) calentar la muestra hasta aproximadamente -12 °C a aproximadamente 1,3 °C/min y, después, conservar la muestra a aproximadamente -12 °C durante aproximadamente 360 minutos;
- 25 (d) enfriar la muestra hasta aproximadamente -50 °C a aproximadamente 0,6 °C/min y, después, conservar la muestra a aproximadamente -50 °C durante aproximadamente 120 minutos;
(e) ajustar la presión ambiente sobre la muestra hasta aproximadamente 100 mTorr;
(f) mantener la presión a aproximadamente 100 mTorr; calentar la muestra hasta aproximadamente -25 °C a aproximadamente 0,2 °C/min y, después, conservar la muestra a aproximadamente -25 °C durante aproximadamente 1.600 minutos;
- 30 (g) calentar la muestra hasta aproximadamente 25 °C a aproximadamente 0,03 °C/min y reducir la presión hasta aproximadamente 50 mTorr y, después, conservar la muestra a aproximadamente 25 °C y a aproximadamente 50 mTorr durante aproximadamente 800 minutos;

35 que comprende:

- (a) equilibrar una muestra de aproximadamente 100 mg/ml de la proteína hasta aproximadamente 4° C;
(b) enfriar la muestra hasta aproximadamente -50 °C a aproximadamente -0,5 °C/min y, después, conservar la muestra a aproximadamente -50 °C durante aproximadamente 120 minutos;
- 40 (c) calentar la muestra hasta aproximadamente -12 °C a aproximadamente 1,3 °C/min y, después, conservar la muestra a aproximadamente -12 °C durante aproximadamente 360 minutos;
(d) enfriar la muestra hasta aproximadamente -50 °C a aproximadamente 0,6 °C/min y, después, conservar la muestra a aproximadamente -50 °C durante aproximadamente 120 minutos;
(e) ajustar la presión ambiente sobre la muestra hasta aproximadamente 100 mTorr;
- 45 (f) mantener la presión a aproximadamente 100 mTorr; calentar la muestra hasta aproximadamente -25 °C a aproximadamente 0,2 °C/min y, después, conservar la muestra a aproximadamente -25 °C durante aproximadamente 1.600 minutos;
(g) calentar la muestra hasta aproximadamente 25 °C a aproximadamente 0,03 °C/min y reducir la presión hasta aproximadamente 50 mTorr y, después, conservar la muestra a aproximadamente 25 °C y a aproximadamente 50 mTorr durante aproximadamente 800 minutos; en la que la proteína comprende una región Fc de un anticuerpo o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma;
- 50

que comprende:

- 55 (a) equilibrar una muestra de aproximadamente 100 mg/ml de la proteína hasta aproximadamente 4° C;
(b) enfriar la muestra hasta aproximadamente -50 °C a aproximadamente -0,5 °C/min y, después, conservar la muestra a aproximadamente -50 °C durante aproximadamente 120 minutos;
(c) calentar la muestra hasta aproximadamente -12 °C a aproximadamente 1,3 °C/min y, después, conservar la muestra a aproximadamente -12 °C durante aproximadamente 360 minutos;
- 60 (d) enfriar la muestra hasta aproximadamente -50 °C a aproximadamente 0,6 °C/min y, después, conservar la muestra a aproximadamente -50 °C durante aproximadamente 120 minutos;
(e) ajustar la presión ambiente sobre la muestra hasta aproximadamente 100 mTorr;
(f) mantener la presión a aproximadamente 100 mTorr; calentar la muestra hasta aproximadamente -25 °C a aproximadamente 0,2 °C/min y, después, conservar la muestra a aproximadamente -25 °C durante aproximadamente 1.600 minutos;
- 65 (g) calentar la muestra hasta aproximadamente 25 °C a aproximadamente 0,03 °C/min y reducir la presión hasta

ES 2 390 354 T3

aproximadamente 50 mTorr y, después, conservar la muestra a aproximadamente 25 °C y a aproximadamente 50 mTorr durante aproximadamente 800 minutos;

en la que la proteína comprende una región Fc de un anticuerpo; que comprende:

- 5
- (a) equilibrar una muestra de aproximadamente 100 mg/ml de la proteína hasta aproximadamente 4° C;
 - (b) enfriar la muestra hasta aproximadamente -50 °C a aproximadamente -0,5 °C/min y, después, conservar la muestra a aproximadamente -50 °C durante aproximadamente 120 minutos;
 - 10 (c) calentar la muestra hasta aproximadamente -12 °C a aproximadamente 1,3 °C/min y, después, conservar la muestra a aproximadamente -12 °C durante aproximadamente 360 minutos;
 - (d) enfriar la muestra hasta aproximadamente -50 °C a aproximadamente 0,6 °C/min y, después, conservar la muestra a aproximadamente -50 °C durante aproximadamente 120 minutos;
 - (e) ajustar la presión ambiente sobre la muestra hasta aproximadamente 100 mTorr;
 - 15 (f) mantener la presión a aproximadamente 100 mTorr; calentar la muestra hasta aproximadamente -25 °C a aproximadamente 0,2 °C/min y, después, conservar la muestra a aproximadamente -25 °C durante aproximadamente 1.600 minutos;
 - (g) calentar la muestra hasta aproximadamente 25 °C a aproximadamente 0,03 °C/min y reducir la presión hasta aproximadamente 50 mTorr y, después, conservar la muestra a aproximadamente 25 °C y a aproximadamente 50 mTorr durante aproximadamente 800 minutos;

20

en la que la proteína es Fc-IL-1-ra; que comprende:

- (a) equilibrar una muestra de 100 mg/ml de la proteína hasta 4° C;
- 25 (b) enfriar la muestra hasta -50 °C a -0,5 °C/min y, después, conservar la muestra a -50 °C durante 120 minutos;
- (c) calentar la muestra hasta -12 °C a 1,3 °C/min y, después, conservar la muestra a -12 °C durante 360 minutos;
- (d) enfriar la muestra hasta -50 °C a 0,6 °C/min y, después, conservar la muestra a -50 °C durante 120 minutos;
- (e) ajustar la presión ambiente sobre la muestra hasta 100 mTorr;
- 30 (f) mantener la presión a 100 mTorr, calentar las muestras hasta -25 °C a 0,2 °C/min y, después, conservar la muestra a -25 °C durante aproximadamente 1.600 minutos;
- (g) calentar la muestra hasta 25 °C a 0,03 °C/min y reducir la presión hasta 50 mTorr y, después, conservar la muestra a 25 °C y a 50 mTorr durante 800 minutos;

35 que comprende:

- (a) equilibrar una muestra de 100 mg/ml de la proteína hasta 4° C;
- (b) enfriar la muestra hasta -50 °C a -0,5 °C/min y, después, conservar la muestra a -50 °C durante 120 minutos;
- (c) calentar la muestra hasta -12 °C a 1,3 °C/min y, después, conservar la muestra a -12 °C durante 360 minutos;
- 40 (d) enfriar la muestra hasta -50 °C a 0,6 °C/min y, después, conservar la muestra a -50 °C durante 120 minutos;
- (e) ajustar la presión ambiente sobre la muestra hasta 100 mTorr;
- (f) mantener la presión a 100 mTorr, calentar la muestra hasta -25 °C a 0,2 °C/min y, después, conservar la muestra a -25 °C durante aproximadamente 1.600 minutos;
- 45 (g) calentar la muestra hasta 25 °C a 0,03 °C/min y reducir la presión hasta 50 mTorr y, después, conservar la muestra a 25 °C y a 50 mTorr durante 800 minutos;

en la que la proteína comprende una región Fc de un anticuerpo, o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma; que comprende:

- 50 (a) equilibrar una muestra de 100 mg/ml de la proteína hasta 4° C;
- (b) enfriar la muestra hasta -50 °C a -0,5 °C/min y, después, conservar la muestra a -50 °C durante 120 minutos;
- (b) calentar la muestra hasta -12 °C a 1,3 °C/min y, después, conservar la muestra a -12 °C durante 360 minutos;
- (d) enfriar la muestra hasta -50 °C a 0,6 °C/min y, después, conservar la muestra a -50 °C durante 120 minutos;
- 55 (e) ajustar la presión ambiente sobre la muestra hasta 100 mTorr;
- (f) mantener la presión a 100 mTorr, calentar la muestra hasta -25 °C a 0,2 °C/min y, después, conservar la muestra a -25 °C durante aproximadamente 1.600 minutos;
- (g) calentar la muestra hasta 25 °C a 0,03 °C/min y reducir la presión hasta 50 mTorr y, después, conservar la muestra a 25 °C y a 50 mTorr durante 800 minutos;

60

en la que la proteína comprende una región Fc de un anticuerpo; que comprende:

- (a) equilibrar una muestra de 100 mg/ml de la proteína hasta 4° C;
- (b) enfriar la muestra hasta -50 °C a -0,5 °C/min y, después, conservar la muestra a -50 °C durante 120 minutos;
- 65 (c) calentar la muestra hasta -12 °C a 1,3 °C/min y, después, conservar la muestra a -12 °C durante 360 minutos;

- (d) enfriar la muestra hasta -50 °C a 0,6 °C/min y, después, conservar la muestra a -50 °C durante 120 minutos;
- (e) ajustar la presión ambiente sobre la muestra hasta 100 mTorr;
- (f) mantener la presión a 100 mTorr, calentar la muestra hasta -25 °C a 0,2 °C/min y, después, conservar la muestra a -25 °C durante aproximadamente 1.600 minutos;
- 5 (g) calentar la muestra hasta 25 °C a 0,03 °C/min y reducir la presión hasta 50 mTorr y, después, conservar la muestra a 25 °C y a 50 mTorr durante 800 minutos;

en la que la proteína es Fc-IL-1-ra;

- 10 También se describe un vial sellado que tiene dispuesto en su interior en condiciones de esterilidad y a presión reducida una composición de liofilizado estéril, en ciertas realizaciones un liofilizado farmacéutico de acuerdo con cualquiera de los anteriores o con los siguientes y puede tener cualquiera de las características siguientes: un tabique a través del cual se puede introducir una aguja hipodérmica estéril en condiciones asépticas para añadir diluyente y extraer la solución resultante;
- 15 la composición es una dosis unitaria de un fármaco para uso humano, o una múltiple del mismo; la composición se dispone en su interior al vacío por debajo de 500 mTorr; el liofilizado dispuesto en el mismo se produce mediante un procedimiento de acuerdo con cualquiera de los procedimientos anteriores o siguientes;
- 20 el liofilizado es adecuado para la administración a un sujeto humano y la proteína comprende una región Fc de un anticuerpo o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma. los liofilizados son adecuados para la administración a un sujeto humano y la proteína comprende una región Fc de un anticuerpo humano o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo. el liofilizado es adecuado para la administración a un sujeto humano y la proteína comprende una región Fc de un anticuerpo humanizado o una variante, derivado, fragmento o mimético de los mismos.
- 25 una proteína de fusión Fc, en la que en tres minutos o menos tras la adición de un diluyente a dicho liofilizado: (a) el liofilizado está al menos un 90 % +/-10 % disuelto; (b) la altura de la espuma por encima de la solución resultante es inferior al 35 % de la altura de la espuma por encima de la solución más la altura de la solución; (c) no hay ninguna efervescencia visible en la solución; y (d) la solución resultante comprende una proteína de fusión Fc a una concentración de aproximadamente 40 mg/ml o más, aproximadamente 3 % o 4 % de manitol y aproximadamente
- 30 1,5 % a 2,5 % de sacarosa; una proteína de fusión Fc, en la que la solución resultante comprende la proteína de fusión Fc a aproximadamente 50 mg/ml en Tris aproximadamente 10 mM a 20 mM, aproximadamente 4,0 % de manitol, aproximadamente 2,0 % de sacarosa, y aproximadamente 0,001 % a 0,01 % de polisorbato, a un pH de aproximadamente 7,2 a 7,6; el liofilizado es adecuado para administrar a un sujeto humano y la proteína es Fc-IL-1-ra;
- 35 el liofilizado es adecuado para administrar a un sujeto humano, la proteína es Fc-IL-1.A, y en la que además en tres minutos o menos tras la adición de un diluyente a dicho liofilizado: (a) el liofilizado está al menos 90 % +/-10 % disuelto; (b) la altura de la espuma encima de la solución resultante es menos que cualquiera de 35 % de la altura de la espuma encima de la solución más la altura de la solución;
- 40 (c) no hay efervescencia visible en la solución; y (d) la solución resultante contiene Fc-IL-1-ra a una concentración de aproximadamente 100 mg/ml, en histidina aproximadamente 20 mM, aproximadamente 3,3 % de manitol, aproximadamente 2,0 % de sacarosa, aproximadamente 0,01 % de polisorbato 20 a un pH de aproximadamente 5,0; un tabique a través del cual se puede introducir una aguja hipodérmica estéril en condiciones asépticas para añadir diluyente y extraer la solución resultante;
- 45 También se describe un procedimiento para determinar polimorfos en una muestra de acuerdo cualquiera de los anteriores o los siguientes, que comprende analizar los espectros de imagen Raman del segundo derivado obtenidos de una muestra que usa un algoritmo basado en los mínimos cuadrados parciales que separa los
- 50 espectros de polimorfos solapantes y cuantifica las cantidades de los polimorfos en la muestra basada en la misma. También se describe un procedimiento para determinar polimorfos de manitol en una muestra de acuerdo cualquiera de los anteriores o los siguientes, que comprende analizar los espectros de imagen Raman del segundo derivado obtenidos de una muestra que usa un algoritmo basado en los mínimos cuadrados parciales que separa los
- 55 espectros de polimorfos solapantes y cuantifica las cantidades de los polimorfos de manitol en la muestra y puede comprender analizar los espectros de imagen Raman del segundo derivado obtenidos usando un algoritmo basado en los mínimos cuadrados parciales que separa los espectros de polimorfos solapantes y cuantifica las cantidades de alfa manitol, beta manitol, delta manitol, manitol hidrato y manitol amorfo.
- 60 También se describe un procedimiento para desarrollar un algoritmo para cuantificar diferentes polimorfos de una sustancia en una muestra de acuerdo con cualquiera de los anteriores o los siguientes, que comprende: (a) determinar los espectros de Raman de los diferentes polimorfos de la sustancia que se va a determinar; (b) añadir los espectros a otro en proporciones variables para simular los espectros de mezclas de los polimorfos entre sí; (c) analizar los espectros mixtos simulados usando análisis de mínimos cuadrados parcial; y (d) a partir de los análisis
- 65 derivan un rutina de separación basado en mínimos cuadrados parcial para cuantificar las cantidades relativas de los polimorfos individuales en una mezcla.

También se describe un procedimiento para determinar polimorfos de una sustancia en una mezcla de acuerdo con cualquiera de los anteriores o de los siguientes, que comprende determinar los espectros de imagen de Raman de una multiplicidad de áreas definidas de una muestra, aplicar una rutina de separación de mínimos cuadrados parcial a cada uno de dichos espectros, de modo que se obtiene una medida cuantitativa de las cantidades respecto unas de otras de los polimorfos de la sustancia en la muestra.

También se describe un procedimiento para obtener un programa para cuantificar diferentes formas polimórficas de una sustancia en una muestra, que comprende:

(a) obtener un espectro de Raman para cada forma polimórfica que se va a determinar; (b) normalizar los espectros a la tira -CH a aproximadamente 2800 cm^{-1} ; (c) obtener espectros derivados para los espectros normalizados; (d) mediante adición lineal de los espectros derivados que derivan un conjunto de calibración de los espectros; (e) usando un algoritmo de mínimos cuadrados parciales para analizar el conjunto de calibración de espectros para generar un programa para cuantificar la cantidad de cada polimorfo en una muestra que se va a analizar.

También se describe un procedimiento para cuantificar polimorfos de una sustancia en una muestra que comprende (a) obtener un espectro de Raman para cada forma polimórfica que se va a determinar; (b) normalizar los espectros a la tira -CH a aproximadamente 2800 cm^{-1} ; (c) obtener espectros derivados para los espectros normalizados; (d) mediante adición lineal de los espectros derivados que derivan un conjunto de calibración de los espectros; (e) usando un algoritmo de mínimos cuadrados parciales para analizar el conjunto de calibración de espectros para generar un programa para cuantificar la cantidad de cada polimorfo en una muestra que se va a analizar; (f) obtener el espectro de Raman de la muestra y (g) procesar el espectro de Raman usando el programa para cuantificar los polimorfos en la muestra y la muestra puede ser un sólido y los espectros de Raman se pueden obtener mediante espectroscopia de imagen de Raman y pueden además comprender corregir el espectro de la muestra para la contribución de otros componentes y cuantificar los polimorfos basados en el espectro corregido.

También se describe un procedimiento, de acuerdo con los anteriores o los siguientes, para determinar la distribución de diferentes formas sólidas en las muestras usando datos de imagen de Raman, que comprende obtener datos de imagen de Raman bidimensionales sobre un campo de una muestra, aplicando un programa, derivado del análisis PLS de espectros de Raman de calibración computada, a los datos de imagen bidimensional para cuantificar las proporciones relativas de cada forma sólida que se va a determinar para cada píxel medido en el campo de muestras, de modo que se obtiene la distribución espacial cuantitativa de las diferentes formas en la muestra y, opcionalmente, mostrar la distribución de una o más formas determinadas de este modo usando una escala de color en una representación de la superficie de la muestra.

Se describe un procedimiento para determinar polimorfos de una sustancia en una mezcla de acuerdo con cualquiera de los anteriores o de los siguientes, que comprende la adquisición de espectros de imagen de Raman a través de un instrumento que comprende en unión operable un criostato de vacío montado operablemente sobre un estadio de microscopio e unión óptica operable a través de una lente de objetivo con un espectrómetro de imagen de Raman.

Se describe un procedimiento para determinar polimorfos de una sustancia en una mezcla de acuerdo con cualquiera de los anteriores o de los siguientes, que comprende la adquisición de espectros de imagen de Raman a través de un instrumento que comprende en unión operable un criostato de vacío montado operablemente sobre un estadio de microscopio e unión óptica operable a través de una lente de objetivo con un espectrómetro de imagen de Raman, en el que el criostato de vacío es eficaz para la liofilización controlada de las muestras y la óptica de imagen de Raman a través de dicha unión óptica operable es eficaz para la adquisición el tiempo real de espectros de Raman de muestras durante la liofilización.

También se describe un procedimiento para determinar polimorfos de una sustancia en una mezcla de acuerdo con cualquiera de los anteriores o de los siguientes, que comprende la adquisición de espectros de imagen de Raman a través de un instrumento que comprende en unión operable un criostato de vacío montado operablemente sobre un estadio de microscopio e unión óptica operable a través de una lente de objetivo con un espectrómetro de imagen de Raman, en el que el criostato de vacío es eficaz para la liofilización controlada de las muestras y la óptica de imagen de Raman a través de dicha unión óptica operable es eficaz para la adquisición el tiempo real de espectros de Raman de muestras durante la liofilización, en el que además la sustancia es manitol y los polimorfos son el alfa manitol, el beta manitol y el delta manitol, manitol hidrato y manitol amorfo.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un gráfico que muestra un programa típico para producir liofilizados proteicos que se reconstituyen rápida y fiablemente en diluyente para proporcionar formulaciones proteicas altamente concentradas.

La Figura 2 es un gráfico que muestra la estabilidad de etanercept liofilizado determinada como se describe en el Ejemplo 26.

La Figura 3 es un gráfico que muestra la distribución de los polimorfos de manitol determinada mediante espectroscopia de imagen de Raman PLS durante el proceso mediante procedimientos de liofilización que solo

difieren en las velocidades de enfriamiento: Panel (A) 1° C/min y Panel (B) 10° C/min. El porcentaje de alfa, beta y delta manitol, manitol hidrato y manitol amorfo se muestra durante el curso de las etapas de hibridación y desecación, como se ha indicado.

5 La Figura es un gráfico que muestra el tiempo de reconstitución y la altura de la espuma como función de la concentración de manitol para composiciones de liofilizado que comprenden la proteína preparada con temperaturas de hibridación de -12 °C y -15 °C. El manitol está indicado en el eje horizontal en la parte inferior del gráfico. El tiempo de reconstitución se indica en segundos en el eje vertical izquierdo. La altura de la espuma se indica como un porcentaje de la altura total (volumen más espuma) en el eje vertical derecho. Los círculos rellenos indican los datos de la altura de la espuma para hibridar a -12 °C. Los círculos abiertos indican datos de la altura de la espuma para hibridar a -15 °C. Los triángulos indican los datos del tiempo de reconstitución para hibridar a -12 °C. Los rombos indican los datos del tiempo de reconstitución para hibridar a -15 °C.

10 La Figura 5 es un gráfico que muestra la relación entre el área de superficie y las propiedades de reconstitución. La Figura 6 es un gráfico que muestra la relación entre el tiempo de reconstitución y el porcentaje de polimorfos de manitol, particularmente delta manitol.

15 La Figura 7 es un gráfico que muestra la relación entre la altura de la espuma y el porcentaje de manitol hidrato en el liofilizado.

20 Glosario

“Un y una” como se usa en el presente documento significa lo mismo que “uno(a) o más de uno(a)” y lo mismo que “al menos uno(a)” sin limitación adicional, excepto lo que se indique explícitamente.

25 “Agonista”, como se usa en el presente documento, significa una entidad molecular que es diferente de un correspondiente ligando estimulador pero tiene el mismo efecto estimulador. Por ejemplo (aunque los agonistas funcionan a través de otros mecanismos), para una hormona que estimula una actividad mediante la unión a un correspondiente receptor de hormona, un agonista es una entidad químicamente diferente que se une al receptor hormona y estimula la misma actividad que la hormona.

30 “Hibridar”, como se usa en el presente documento, significa un tratamiento térmico que altera la microestructura de un material y cambia sus propiedades, normalmente proporcionando cristales sin defectos y minimizando tensiones internas. Hibridar normalmente implica calentar hasta una temperatura a la cual el material es demasiado duro como para que se deforme pero es lo bastante blando como para que se liberen las tensiones internas y, después, conservar el material a dicha temperatura hasta que esté completamente equilibrada.

35 En el contexto de la presente invención, hibridar implica particularmente conservar el liofilizado a una temperatura de hibridación para un periodo definido para garantizar la cristalización (relativamente libre de defectos en el cristal) de los componentes cristalizables en la formulación, particularmente el agente espesante. La hibridación garantiza que dichos componentes, particularmente el agente espesante, sean estables y no cristalicen durante la etapa de desecación. La inestabilidad puede tener como resultado poca formación de tortas y características de solubilidad baja. La cristalización durante la etapa de desecación a menudo produce pérdida de estabilidad proteica en la torta del liofilizado y rotura del vial, entre otros efectos perjudiciales.

45 En general, la temperatura de hibridación deberá estar entre la T_v de la fase amorfa y la temperatura eutéctica del agente espesante para dar elevadas tasas de cristalización y maximizar la cristalización.

50 “Antagonista(s)”, como se usa en el presente documento, significa una entidad molecular que es diferente de un correspondiente ligando y tiene un efecto opuesto. Por ejemplo (aunque los antagonistas funcionan a través de otros mecanismos), un tipo de antagonista de una hormona que estimula una actividad mediante la unión a un correspondiente receptor hormonal es una entidad química que es diferente de la hormona y se une al receptor de la hormona pero no estimula la actividad generada por la unión de la hormona y, mediante esta acción, inhibe la actividad efectora de la hormona.

55 “Anticuerpo(s)” se usa en el presente documento de acuerdo con su significado habitual en las técnicas bioquímica y biotecnológica. Entre los anticuerpos dentro del significado del término como se usa en el presente documento son los aislados de fuentes biológicas, incluidos anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos fabricados mediante técnicas de ADN recombinante (en ocasiones también denominados en el presente documento anticuerpos recombinantes), incluidos los fabricados mediante procedimientos que implican la activación de un gen endógeno y los que implican la expresión de una construcción de expresión exógena, incluidos los anticuerpos fabricados en cultivos celulares y los fabricados en plantas y animales transgénicos, y anticuerpos fabricados mediante procedimientos que implican síntesis química, incluidas síntesis y semisíntesis peptídica. También dentro del alcance del término tal como se usa en el presente documento, excepto cuando se indique explícitamente lo contrario, se encuentran los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos híbridos, entre otros.

65 El anticuerpo prototipo es una glicoproteína tetramérica compuesta por dos dímeros idénticos de cadena ligera-cadena pesada unidos entre sí por puentes disulfuro. En vertebrados, existen dos tipos de cadenas ligeras, kappa y

lambda. Cada cadena ligera está compuesta por una región constante y una región variable. Las dos cadenas ligeras se distinguen por secuencias de la región constante. Existen cinco tipos de cadenas pesadas en los vertebrados: alfa, delta, Epsilon, gamma y mu. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable y tres regiones constantes. Los cinco tipos de cadenas pesadas definen cinco clases de anticuerpos en vertebrados (isotipos): IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Cada isotipo está formado por, respectivamente, (a) dos cadenas pesadas alfa, delta, epsilon, gamma o mu, y (b) dos cadenas ligeras kappa o lambda. Las cadenas pesadas en cada clase se asocian con ambos tipos de cadenas ligeras; pero las dos cadenas ligeras en una molécula dada son ambas kappa o ambas lambda. IgD, IgE, e IgG en general se encuentran como glicoproteínas heterotetraméricas "libres". IgA e IgM generalmente se encuentran en complejos que comprenden varios heterotetrámeros de IgA o varios de IgM asociados con un polipéptido de la cadena "J". Algunos isotipos de vertebrados se clasifican en subclases que se distinguen entre sí por diferencias en las secuencias de la región constante. Hay cuatro subclases de IgG humanas, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y dos subclases de IgA, IgA1 e IgA2, por ejemplo. Todas estas y otras no descritas específicamente anteriormente se incluyen en el significado del término "anticuerpo(s)" como se usa en el presente documento.

El término "anticuerpo(s)" incluye además variantes de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las anteriores como se describe más adelante en otro lugar.

"Derivado de anticuerpo", como se usa en el presente documento, significa cualquier proteína producida a partir de un anticuerpo y cualquier proteína de un diseño basado en un anticuerpo. El término incluye en su significado proteínas producidas usando todo o parte de un anticuerpo, que comprenden todo o parte de un anticuerpo, y los diseñados en su totalidad o en parte sobre la base de todos o parte de un anticuerpo. Proteínas "derivadas de anticuerpo" incluyen, entre otras, fragmentos Fc, Fab y Fab₂ y proteínas que los comprenden, fragmentos del dominio V_H y del dominio V_L y proteínas que comprenden los mismos, otras proteínas que comprenden una región variable y/o constante de un anticuerpo, completa o en parte, intracuerpos scFv(s), maxicuerpos, minicuerpos, diacuerpos, variantes de la secuencia de aminoácidos de los anteriores y una diversidad de otras de estas moléculas, incluidas, entre otras, otras descritas en otros lugares del presente documento.

"Relacionado con anticuerpo", como se usa en el presente documento, significa cualquier proteína o mimético de estructura, función o diseño similar a un anticuerpo o a cualquier parte de un anticuerpo. Entre las proteínas "relacionadas con anticuerpos", como se usa el término en el presente documento, son las proteínas "derivadas de anticuerpo" como se ha descrito anteriormente. Cabe destacar que las expresiones "derivado de anticuerpo" y "relacionado con anticuerpos" se solapan sustancialmente; ambas expresiones se aplican a muchas de estas proteínas. Ejemplos de proteínas "relacionadas con anticuerpos", sin implicar limitaciones a este respecto, se encuentran los peptidocuerpos y los receptocuerpos. Otros ejemplos de proteínas "relacionadas con anticuerpos" se describen en otro lugar en el presente documento.

"Polipéptido(s) de anticuerpo", como se usa en el presente documento, excepto si se indica lo contrario, significa un polipéptido que es parte de un anticuerpo, tal como un polipéptido de cadena ligera, un polipéptido de cadena pesada y un polipéptido de cadena J, por mencionar algunos ejemplos, incluidos entre otros fragmentos, derivados y variantes de los mismos, y polipéptidos relacionados.

"Aproximadamente" se usa en el presente documento para decir dentro de una determinada fracción de porcentaje de un valor indicado y, a menos que se indique lo contrario, el término indica nominalmente una variación sobre el valor indicado de más o menos 20 %, preferentemente más o menos 10 %, muy preferentemente más o menos 5 %.

"Resto(s) de unión" significa una parte de una molécula o un complejo de moléculas que se une específicamente a parte de otra molécula o un complejo de moléculas. El resto de unión puede ser igual o diferente al de la parte de la molécula o complejo de moléculas a la que se une. El resto de unión también puede ser toda una molécula o complejo de moléculas.

"Se une específicamente" se usa en el presente documento de acuerdo con su significado habitual en la técnica y significa, excepto cuando se indique lo contrario, que la unión es más fuerte con determinados restos específicos que con otros restos en general, que es más fuerte que la unión no específica que se puede producir con una amplia variedad de restos y que la unión es selectiva para determinados restos y no se producen de un modo tan fuerte con otros. En el caso extremo de la unión específica se produce una unión fuerte con un solo tipo de resto y no hay una unión inespecífica con ningún otro resto.

"Composición" significa cualquier composición de materia que comprende uno o más constituyentes, tal como una formulación.

"Compuesto por" es un sinónimo de "que comprende" (véase más adelante).

"Que comprende" significa incluyendo, sin otra cualificación, limitación o exclusión en cuanto a que más puede o no incluirse. Por ejemplo, "una composición que comprende x e y" significa cualquier composición que contiene x e y, con independencia de lo demás que pueda contener. Asimismo, "un procedimiento que comprende x" es cualquier

procedimiento en el que x se lleva a cabo, con independencia de lo demás que se pueda producir.

5 "Derivado(s)" se usa en el presente documento para decir derivado de, en sustancia, forma o diseño, tal como, por ejemplo, un polipéptido que está basado en, pero difiere del mismo, un polipéptido de referencia mediante, por ejemplo, alteraciones en su secuencia de aminoácidos, mediante fusión con otro polipéptido o mediante modificación covalente.

10 En general, "cantidad efectiva" significa una cantidad que proporciona el efecto local o sistémico deseado. Por ejemplo, una cantidad efectiva es una cantidad suficiente para efectuar un resultado clínico beneficioso o deseado. La cantidad efectiva se puede proporcionar de una vez en una sola administración o en cantidades fraccionadas que proporcionan la cantidad efectiva en varias administraciones. La determinación precisa de lo que se consideraría una cantidad efectiva se puede basar en factores individuales de cada sujeto, incluyendo su tamaño, edad, lesión y/o enfermedad o lesión que se esté tratando y la cantidad de tiempo desde que se produjo la lesión o comenzó la enfermedad. Un experto en la técnica podrá determinar la cantidad efectiva para un sujeto dado en base a estas consideraciones, que son rutinarias en la técnica. Como se usa en el presente documento "dosis efectiva" significa lo mismo que "cantidad efectiva".

20 "Vía efectiva" generalmente significa una vía que proporciona la liberación de un agente en un compartimento, sistema o localización deseados. Por ejemplo, una vía efectiva es una a través de la cual un agente se puede administrar para proporcionar en el sitio deseado de acción una cantidad del agente suficiente para efectuar un resultado clínico beneficioso o deseado.

25 "Etanercept" es una proteína de fusión que contiene el dominio extracelular del receptor p75 del TNFalfa condensado a un dominio Fc de un anticuerpo IgG1. La proteína de fusión dimérica resultante se une al TNF alfa e inhibe la actividad del TNF alfa. Etanercept está disponible comercialmente como la marca Enbrel® de Amgen Inc. (Thousand Oaks, California). Véase, por ejemplo, el prospecto de Enbrel®, Immunex Corp.; Moreland y col., Ann Intern Med 130: 478-486 (1999); E.C. Keystone y col., Arthritis Rheum 50: 353-363 (2004); M.E. Weinblatt y col., NEngl J Med 340: 253-259 (1999); Klareskog y col., Lancet 363: 675-681 (2004); Gorman y col., NEngl J Med 346: 1349-1356 (2002); P.J. Mease y col., Lancet 356: 385-390 (2000); y C.L. Leonardi y col., N Engl J Med 349: 2014-2022 (2003), en particular en las partes pertinentes a la estructura y las actividades de etanercept.

35 "Fc-IL-1 ra" es una proteína de fusión antagonista del receptor de IL-1 que está formada por una secuencia de Fc de un anticuerpo y la secuencia de un resto de unión al receptor de IL-1 del antagonista del receptor de IL-1 IL-1 ra. Fc-IL-1-ra también se denomina IL1ra-Fc y r-metHu-Fc-IL-1-ra. Las proteínas de fusión Fc-IL-1 ra y la información relacionada sobre Fc-IL-1 ra se divulgan en la patente de EE.UU. nº 6,294,170 de Boone y col., para "Composición y procedimiento para tratar enfermedades inflamatorias" emitida el 25 de septiembre de 2001, en concreto en las partes pertinentes a la estructura, formulación y uso de proteínas de fusión que comprenden el antagonista del receptor de la interleuquina 2 IL-1 ra o secuencias polipeptídicas relacionadas, como se ha descrito en la misma.

40 "Fragmento(s)" en el presente documento significa parte de una entidad más grande, tal como una parte de una proteína; por ejemplo un polipéptido que consiste en menos de la totalidad de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido más grande. Como se usa en el presente documento, el término incluye fragmentos formados mediante deleción terminal y fragmentos formados mediante deleción interna, incluidos aquellos en los que dos o más porciones no contiguas de un polipéptido se unen para formar un polipéptido más pequeño, que es un fragmento del original.

50 En el presente documento "Proteína(s) de fusión" significa una proteína formada condensando todos o parte de dos polipéptidos que pueden ser iguales o diferentes. Las proteínas de fusión típicas están hechas mediante técnicas de ADN recombinante, mediante unión de extremo a extremo de los nucleótidos que codifican los dos (o más) polipéptidos. Por ejemplo, una proteína de fusión Fc es una proteína formada mediante condensación de una proteína Fc a otra proteína.

55 En el presente documento "sometido a ingeniería genética" significa producido usando un proceso deliberado de alteración genética, tal como mediante tecnología de ADN recombinante, procedimientos clásicos de manipulación genética, procedimientos químicos, una combinación de los tres u otros procedimientos.

60 "Temperatura de transición vítrea" es la temperatura por debajo de la cual una sustancia pierde sus propiedades elásticas y se convierte en dura y frágil (sólida) y por encima de la cual es elástica (en general, cerca de la temperatura de transición del vidrio).

"Concentración elevada", como se usa en el presente documento con referencia a las composiciones terapéuticas proteicas, significa 40 mg/ml l más.

65 En el presente documento, "homólogo(s)" significa que tiene homología con otra entidad, tal como una proteína que es homóloga de otra proteína. Homólogo quiere decir de estructura o función similar.

En el presente documento, "ligando(s)" significa una entidad molecular que se une de forma selectiva o estequiométrica a uno o más sitios específicos sobre una o más de otras entidades moleculares. Normalmente, la unión es no covalente, pero también puede ser covalente. Algunos ejemplos son, entre muchos otros, (a) antígenos, que normalmente se unen de forma no covalente a los sitios de unión sobre anticuerpos afines; (b) hormonas, que normalmente se unen a receptores hormonales de forma no covalente; (c) lectinas, que se unen a azúcares específicos, de forma no covalente; (d) biotinas, que se unen en múltiples sitios de la avidina y otras proteínas similares a la avidina; de forma no covalente; (e) antagonistas hormonales, que se unen a receptores de hormonas e inhiben su actividad y/o la de la hormona correspondiente; y (f) agonistas hormonales, que de forma similar se unen a receptores hormonales pero estimulan su actividad.

En el presente documento, "resto(s) de unión a ligando" significa una entidad molecular que se une a un ligando, normalmente una parte de una entidad molecular más grande que se une al ligando o una entidad molecular derivada del mismo.

En el presente documento, "proteína(s) de unión al ligando" significa una proteína que se une a un ligando.

En el presente documento, "resto(s) de ligando" significa una entidad molecular que se une a una entidad molecular de unión a ligando de un modo muy parecido a como lo hace el correspondiente ligando. Un resto ligando puede ser todo un ligando o parte de él, derivado de un ligando o generado *de novo*. No obstante, normalmente, el resto ligando es más o menos exclusivamente el aspecto del mismo que se une a las correspondientes entidades de unión a ligando. El resto ligando no tiene que comprender, y el término generalmente no lo indica, características estructurales distintas a las requeridas para la unión al ligando.

"Mimético" se refiere a una entidad química con características estructurales o funcionales de otra entidad química, generalmente no relacionada. Por ejemplo, un tipo de mimético hormonal es una molécula orgánica no peptídica que se une al correspondiente receptor del mismo modo que la propia hormona correspondiente.

En el presente documento "proteína(s) modificada", "polipéptido(s) modificado" o "fragmento(s) modificado" significa una proteína o un polipéptido o un fragmento de una proteína o polipéptido que comprende un resto químico (estructura) distinto a los de los veinte aminoácidos naturales que forman proteínas naturales. Las modificaciones se unen, con mayor frecuencia, de forma covalente, pero también se pueden unir de forma no covalente a una proteína u otro polipéptido, tal como un fragmento de una proteína.

En el presente documento "Resto(s)" significa una entidad que abarca una estructura y/o función específicas sin componentes extraños. Por ejemplo, en la mayoría de los casos, solo una pequeña parte de una proteína de unión a ligando es responsable de la unión al ligando. Esta parte de la proteína, se codifique de forma continua o discontinua, es un ejemplo de un resto de unión a ligando.

"Vacío parcial" significa una presión inferior a la atmosférica y por encima de aproximadamente 250 mTorr.

"Peptidocuerpo" se refiere a una molécula que comprende un dominio Fc de anticuerpo (es decir, los dominios CH2 y CH3 del anticuerpo) que excluye los dominios CH1, CL, VH, y VL del anticuerpo, así como Fab y F(ab)2, en el que el dominio Fc está unido a uno o más péptidos, preferentemente un péptido farmacológicamente activo, particularmente preferentemente un péptido farmacológicamente activo generado aleatoriamente. La producción de peptidocuerpos está descrita, en general, en la publicación PCT WO 00124782, publicada el 4 de mayo de 2000, particularmente en cuanto a estructura, síntesis, propiedades y usos de los peptidocuerpos.

En el presente documento, "péptido(s)" significa lo mismos que polipéptido; a menudo, aunque no necesariamente, se usa en referencia a un polipéptido relativamente corto.

"Farmacéutico", como se usa en el presente documento, significa que es aceptable para usar en un sujeto humano o no humano para el tratamiento del mismo, en particular para usar en seres humanos, y que está aprobado por una autoridad reguladora con poder para regular el uso del mismo, tal como, por ejemplo, la Food and Drug Administration de Estados Unidos, la European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Japan's Ministry of Health, Labor and Welfare, u otras agencias reguladoras, como las indicadas en R. Ng, *Drugs: From Discovery to Approval*, Wiley-Liss (Hoboken, NJ) (2004), particularmente en lo que respecta a las autoridades reguladoras con la aprobación del fármaco, especialmente como se indica en el Capítulo 7. Como se usa en el presente documento, la frase "en la que la composición ha sido aprobado para uso farmacéutico por una autoridad con poder legal para conceder dicha aprobación" significa una entidad o institución o similar, establecida por ley y con la responsabilidad y autoridad legal para regular y aprobar el uso de fármacos en seres humanos y, en algunos casos, en no humanos. La aprobación por una cualquiera de estas agencias en cualquier punto cumple esta cualificación. No es necesario que la agencia de aprobación pertenezca al estado en el que, por ejemplo, se ha producido una infracción. Ejemplos de estas entidades incluyen la Food and Drug Administration de EE.UU. y las otras agencias enumeradas en el presente documento anteriormente.

Como se usa en el presente documento, “farmacéutico/a” también se puede referir a un producto producido de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación, como las descritos en, entre otros, el Capítulo 9 y el Capítulo 10, de R. Ng, *Drugs: From Discovery to Approval*, Wiley-Liss (Hoboken, NJ) (2004), particularmente en las partes pertinentes a las buenas prácticas de fabricación para formulaciones proteicas farmacéuticas, en particular como se indica en los Capítulos 9 y 10.

En el presente documento “farmacéuticamente aceptable” se usa de acuerdo con su significado bien conocido en la técnica para indicar que es aceptable para uso médico o veterinario, preferentemente para uso médico en seres humanos, particularmente aprobado para dicho uso por la Food and Drug Administration de EE.UU. u otra autoridad como se ha descrito anteriormente sobre el significado de “farmacéutico”.

En el presente documento, “polimorfo(s)” significa formas idénticas pero estructuralmente diferentes de una sustancia. Por ejemplo, el manitol es una entidad químicamente distinta con cinco polimorfos. El manitol es el mismo en los cinco polimorfos, pero se organiza de un modo diferente. Tres de los polimorfos son estados cristalinos que difieren entre sí en su organización geométrica de las moléculas de manitol. Una de las formas es manitol monohidrato, que difiere en su geometría de las tres formas cristalinas. El quinto polimorfo es manitol amorfo, que no está organizado de la misma geométricamente precisa manera de las tres formas cristalinas y tampoco está organizado del mismo modo que el hidrato. Aunque el propio manitol es la misma molécula en los cinco polimorfos, la energía, estabilidad y reactividad del manitol difieren entre ellos en algún grado, como resultado de su interacción con los efectos del mismo en los demás, que están afectados por la geometría y por la hidratación. Dado que algunos polimorfos pueden ser más adecuados para una formulación dada que otros, puede ser importante optimizar el tipo y la distribución de los polimorfos en una composición.

Los polimorfos pueden ser estables o pueden ser inestables en condiciones dadas de producción, formulación, almacenamiento y uso. Los polimorfos inestables pueden diferir significativamente en la energía y la cinética de su conversión a formas más estables. Puede ser útil tener en cuenta la interconversión de un polimorfo que se puede producir durante la producción, formulación, almacenamiento y uso de una composición dada y optimizar la formulación para garantizar que la distribución de los polimorfos en la composición se optimiza durante la vida del producto. La optimización, considerablemente, puede depender tanto o más de la cinética o interconversión como de la estabilidad energética de los polimorfos individuales.

“Polipéptido(s)”, véase “Proteína(s).”

En el presente documento “precursor(es)” se usa de acuerdo con su significado conocido en la técnica para indicar una entidad de la que deriva otra entidad. Por ejemplo, una proteína precursora es una proteína que sufre procesamiento, tal como escisión o modificación proteolítica, de modo que da lugar a otra proteína precursora (que sufrirá procesamiento adicional) o a una proteína madura.

En el presente documento, “proteína(s)” significa un polipéptido o un complejo de polipéptidos de acuerdo con su significado conocido en la técnica. Como se usa en el presente documento, “proteína(s)” incluye polipéptidos de cadena lineal y ramificada. Incluye polipéptidos no modificados y modificados, incluidas las modificaciones naturales y las que no se producen de forma natural. Dichas modificaciones incluyen modificaciones químicas de los extremos, la estructura peptídica y las cadenas laterales de aminoácidos; sustituciones, deleciones y adiciones de aminoácidos, e incorporación de aminoácidos no habituales y otros restos, por mencionar solo algunas de dichas modificaciones. Estas incluyen, por ejemplo, modificaciones postraduccionales, tales como, entre otras, glicosilación, fosforilación, acetilación, mutilación, lipidación y ubiquitinilación. También incluye polipéptidos “sometidos a ingeniería” y complejos de los mismos, tales como, entre otros, cualquier polipéptido o complejo de polipéptidos que se han alterado deliberadamente en su estructura mediante, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, síntesis química y/o modificación covalente, incluida la alteración deliberada de la secuencia de aminoácidos y/o modificaciones postraduccionales.

En casos concretos, el término, como se usa en el presente documento, se refiere más específicamente a polipéptidos que aguantan la reconstitución a concentraciones elevadas debido a su peso molecular relativamente alto, su composición química (incluidas las características de las secuencias de aminoácidos, modificaciones y similares) o a ambas cosas.

“Sujeto” significa un vertebrado, tal como un mamífero, tal como un ser humano. Los mamíferos incluyen, entre otros, seres humanos, animales de granja, animales para deportes y animales de compañía. Los sujetos que necesitan tratamiento mediante procedimientos y/o composiciones de la presente invención incluyen los que sufren un trastorno, disfunción o enfermedad o un efecto secundario de la misma o un efecto secundario de un tratamiento de la misma.

En el presente documento, “sustancialmente” se usa de acuerdo con su definición simple y habitual para querer decir en gran medida o grado. Por ejemplo, sustancialmente completo significa completo en gran medida, completo en alto grado. A modo de ilustración adicional, sustancialmente libre de residuos significa libre de residuos en gran medida, libre de residuos en alto grado. Si se requiere precisión numérica, en función del contexto,

"sustancialmente", como se usa en el presente documento, significa al menos un 80 % o más, particularmente un 90 % o más, muy particularmente un 95 % o más.

5 Como se usa en el presente documento, "sustancialmente libre de residuos fácilmente visibles" significa, normalmente respecto a espuma, turbidez, efervescencia, formación de partículas y sedimentos y otro material, que poco o nada de este material es visible para una persona con una buena visión media que observa directamente en condiciones de luz comerciales o residenciales medias y que, además del diluyente, no genera procesos físicos asociados con una o más de formación de espuma, precipitación, efervescencia y/o agregación que alteren la actividad efectiva o la actividad específica del liofilizado de ningún modo que afecte perjudicialmente a su eficacia o aceptabilidad de su aspecto para uso farmacéutico veterinario o humano. Por tanto "sustancialmente libre" a este respecto no solo se aplica cuando no hay espuma, turbidez, efervescencia o formación de partículas y sedimentos, sino también cuando uno o más o todos los anteriores son visibles pero en cantidades tan pequeñas que la eficacia y la aceptabilidad permanecen elevados para uso terapéutico veterinario y/o humano.

15 "Tv" significa la temperatura de transición vítrea, también indicada como Tv.

En el presente documento, "terapéuticamente eficaz" se usa de acuerdo con su significado bien conocido en la técnica para indicar que consigue una mejora en el pronóstico o afección de un sujeto o que, de otro modo, alcanza un objetivo terapéutico, incluida, por ejemplo, una reducción de la velocidad de la progresión de la enfermedad aún cuando la afección de un sujeto continúe deteriorándose.

25 En general, "cantidad terapéuticamente eficaz" se usa para cuantificar la cantidad de una gente que abarca dichas cantidades que alcanzan una mejora en la gravedad del trastorno. Por ejemplo, agentes terapéuticos neoplásicos eficaces prolongan la capacidad de supervivencia del sujeto, inhiben el crecimiento de las células en proliferación rápida asociado con la neoplasia o efectúan una regresión de la neoplasia. Los tratamientos que son terapéuticamente eficaces dentro del significado del término tal como se usa en el presente documento incluyen tratamientos que mejoran la calidad de vida de un sujeto aún cuando no mejoren el resultado de la enfermedad *per se*.

30 "TNFR-Fc" - Véase "Etanercept."

"Tratar", "que trata" o "tratamiento" se usan ampliamente en relación con la invención y cada uno de estos términos abarca, entre otros, prevenir, mejorar, inhibir o curar una deficiencia, disfunción, enfermedad u otro proceso perjudicial, incluidos aquéllos que interfieren en una terapia y/o son el resultado de la misma.

35 "Vacío" significa presiones de 250 mTorr o menores.

En el presente documento, "variante(s)" significa una versión natural o sintética de, por ejemplo, una proteína que es estructuralmente diferente de la original pero de estructura y/o función relacionadas, tales como una variante alélicas, un parólogo o un homólogo de la proteína.

Descripción de la invención

45 La presente invención se refiere a composiciones que proporcionan agentes terapéuticos proteicos a una concentración alta para administrar a un sujeto. En concreto, en ciertas realizaciones altamente preferidas de uno de sus aspectos, la invención proporciona preparaciones estables de agentes terapéuticos proteicos que se pueden reconstituir rápida y fiablemente en formulaciones de concentración alta adecuadas y efectivas para administración subcutánea. El agente terapéutico proteico se prepara mediante liofilización y el liofilizado se puede reconstituir para administrar a una concentración de aproximadamente 40 mg/ml o superior.

50 Se describen procedimientos para producir liofilizados proteicos (y los liofilizados producidos de este modo) que implican un ciclo de liofilización como se representa en la Figura 1, que comprenden tomar una muestra (A), congelarla disminuyendo la temperatura (B), mantenerla a una temperatura reducida (C), elevar la temperatura (D) hasta una temperatura de hibridación e hibridarla manteniendo la temperatura de hibridación (E), reducir la temperatura tras la hibridación (F), conservar la muestra a una temperatura reducida (G), elevar la temperatura hasta una primera temperatura de desecación (H), mantener la muestra durante un periodo de tiempo a la primera temperatura de desecación (i), elevar la temperatura hasta una segunda temperatura de desecación (J), mantener la muestra a la segunda temperatura de desecación (K), de modo que se produce un liofilizado (L) que, en concreto, se disuelve completamente en un diluyente adecuado en 10 minutos para proporcionar una concentración proteica elevada sin espuma, efervescencia, turbidez o formación de partículas o sedimentos visibles.

I. Composiciones y reconstitución de las mismas

A. Liofilizados proteicos y reconstitución de los mismos

65

La presente invención se refiere a un liofilizado que comprende una proteína y manitol, en el que el manitol está compuesto por al menos 70 % de delta manitol, no más de 20 % de manitol hidrato y no más de 10 % de manitol amorfo, en el que el área de superficie del liofilizado es igual o superior a 1,2 m²/g. El manitol puede estar compuesto por al menos 70 % de delta manitol, no más de 10 % de manitol amorfo y no más de 20 % de manitol hidrato más alfa manitol más beta manitol. El área de superficie del liofilizado es igual o superior a 1,2 m²/g y el liofilizado puede además comprender sacarosa. EL liofilizado puede además comprender un tensioactivo o uno o más de un agente espesante, un agente estabilizante y un lioprotector. La proteína puede ser un anticuerpo, o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma, y el anticuerpo puede ser humano o humanizado, o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo. La proteína puede ser una región de un anticuerpo humano o humanizado, o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma. Dicha región puede ser una región Fc, o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma. La proteína puede ser un péptidocuerpo o puede ser una proteína de fusión que comprende una región Fc y un resto de unión a TNF, o un resto de unión a TNF alfa, un resto de unión a IL-1 o un resto de unión al receptor de IL-1, un resto de unión al receptor de IL-1 de la proteína IL-1 ra humana. La proteína puede ser Fc-IL-1 ra.

La invención divulgada en el presente documento proporciona, entre otras cosas, y es útil para preparar, composiciones que contienen proteínas que son liofilizadas que se pueden reconstituir a concentraciones altas en diluyentes adecuados para uso terapéutico veterinario y humano, entre otros. En la presente invención se describen los liofilizados proteicos de la invención a este respecto y pueden incluir las características de las realizaciones descritas más adelante. De forma diversa, las composiciones liofilizadas en las que en tres minutos o menos tras la adición de un diluyente a dicho liofilizado: (a) el liofilizado está al menos un 90 % +/-10 % disuelto; (b) la altura de la espuma por encima de la solución resultante es inferior al 35 % de la altura de la espuma por encima de la solución más la altura de la solución; (c) no hay ninguna efervescencia visible en la solución; y (d) la concentración de dicha proteína en dicho diluyente tras la reconstitución es de al menos 40 mg/ml.

En ciertas realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, en tres minutos de añadir el diluyente: (a) el liofilizado está al menos un 90 % +/-10 % disuelto; (b) la altura de la espuma por encima de la solución resultante es inferior al 25 % de la altura de la espuma más la altura de la solución; y (c) hay efervescencia visible en la solución y/o no hay burbujas visibles en la solución.

En varias realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, en tres minutos de añadir el diluyente: (a) el liofilizado está al menos un 90 % +/-10 % disuelto; (b) la altura de la espuma por encima de la solución resultante es inferior al 15 % de la altura de la espuma más la altura de la solución; y (c) no hay efervescencia visible en la solución.

En algunas realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, en tres minutos de añadir el diluyente: (a) el liofilizado está al menos un 90 % +/-10 % disuelto; (b) la altura de la espuma por encima de la solución resultante es inferior al 5 % de la altura de la espuma más la altura de la solución; y (c) no hay efervescencia visible en la solución.

En varias realizaciones, en lugar de o además de cualquiera de los anteriores, a cualquiera de 1, 2, 3, 5 o 10 minutos de la adición del diluyente: (a) el liofilizado es cualquiera de al menos: 75, 85, 90, 93, 95, 97, 98 o 99 % disuelto; (b) el liofilizado está al menos un 99 % +/-10 % disuelto; (b) la altura de la espuma por encima de la solución resultante es inferior al 3 % de la altura de la espuma más la altura de la solución; y (c) no hay efervescencia visible en la solución.

En varias realizaciones, además de cualquiera de lo anterior, el área de superficie del liofilizado es igual o mayor que cualquiera de 1,2, 1,3 o 1,4 m²/g; En varias realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, el área de superficie del liofilizado es igual o mayor que cualquiera de 1,2, 1,3 o 1,4 m²/g e igual o menor que cualquiera de 1,5, 1,7, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, o 5,0 m²/g; El área de la superficie del liofilizado es igual o mayor que 1,2 m²/g;

En muchas realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, la adición del diluyente tiene como resultado una solución con una concentración de proteínas de aproximadamente 40 a 250 mg/ml. En varias realizaciones es de aproximadamente 40 a 200 mg/ml. En ciertas realizaciones es de aproximadamente 75 a 150 mg/ml. En realizaciones concretas es de aproximadamente 50 a 100 mg/ml.

En muchas realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, la adición del diluyente tiene como resultado una solución con una concentración de proteínas de 40 a 250 mg/ml. En varias realizaciones es de 40 a 200 mg/ml. En ciertas realizaciones es de 75 a 150 mg/ml. En realizaciones concretas es de 50 a 100 mg/ml.

En varias realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, la proteína es estable en las composiciones. En realizaciones a este respecto tiene una estabilidad de al menos aproximadamente cualquiera de 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % durante al menos cualquiera de aproximadamente 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, o 24 meses de almacenamiento a cualquiera de aproximadamente 4, 21, o 37° C. En realizaciones concretas tiene una estabilidad de al menos aproximadamente cualquiera de 85, 90, 95, 97, 98, o 99 % durante al menos cualquiera de aproximadamente 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, o 24 meses de almacenamiento a aproximadamente 4° C. En ciertas realizaciones, tiene una

estabilidad de al menos aproximadamente cualquiera de 95 % durante al menos cualquiera de aproximadamente 4, 5, 6, 9, 12, 18, o 24 meses de almacenamiento a aproximadamente 4° C. En realizaciones concretas tiene una estabilidad de al menos aproximadamente 95 % durante al menos aproximadamente 12 meses de almacenamiento a 4° C

5 Con respecto a cualquiera de los anteriores, la estabilidad en ciertas realizaciones se mide mediante la representación fraccional del "pico" nativo de la forma intacta de la proteína denominada mediante el total de "picos" de la proteína, en otras palabras la cantidad en el "pico principal" dividido por el total de las cantidades en todos los picos, incluido el pico principal. Los picos en este sentido pueden ser picos de una columna de HPLC, bandas en un
10 gel o una transferencia u otras medidas cuantitativas de la forma intacta de una proteína y sus productos de degradación o agregados u otras formas indicativas de inestabilidad.

15 En numerosas realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, en un plazo de 10, 5, 3, 2 o 1 minutos de la adición del diluyente al liofilizado no hay turbidez visible en la solución y/o no hay burbujas visibles en la solución y/o no hay partículas visibles en la solución y/o la solución fluye fácilmente.

20 En numerosas realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, la solución resultante tiene una viscosidad suficientemente baja como para fluir de forma eficiente a través de una aguja hipodérmica de un calibre efectivo para inyección subcutánea en sujetos humanos. En aspectos y realizaciones de la invención a este respecto, la viscosidad de la solución es cualquiera de menos de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, o 100 cP. Por ejemplo, en ciertas realizaciones es inferior a 50 cP. En ciertas realizaciones es inferior a 25 cP. En otras varias realizaciones es inferior a 10 cP.

25 En varias realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, la composición comprende una cualquiera o más de al menos un agente espesante y/o al menos un agente estabilizante y/o al menos un tensioactivo.

30 En ciertas realizaciones a este respecto, además de cualquiera de los anteriores, el agente espesante es manitol. En realizaciones concretas a este respecto, el manitol está compuesto por polimorfos en las cantidades siguientes: igual o mayor que aproximadamente 70 % de delta manitol, igual o menor que aproximadamente 20 % de manitol hidrato e igual o menor que aproximadamente 10 % de manitol amorfo. En varias realizaciones a este respecto también, el manitol está compuesto por polimorfos en las cantidades siguientes: igual o mayor que 70 % de delta manitol, igual o menor que 20 % de manitol hidrato e igual o menor que 10 % de manitol amorfo.

35 En ciertas realizaciones, además de uno cualquiera de los anteriores, el agente estabilizante es sacarosa.

En varias realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, el tensioactivo es polisorbato. En realizaciones concretas a este respecto, la concentración del polisorbato es de 0,004 % a 0,15 %. En numerosas realizaciones a este respecto, el tensioactivo es un polisorbato 80 o un polisorbato 20 en una concentración de 0,004 % a 0,15 %.

40 En ciertas realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, el tensioactivo es Pluronic F68. En realizaciones concretas a este respecto, el tensioactivo es Pluronic F68 en una concentración de 0,05 % a 1,5 %.

45 En ciertas realizaciones, la composición comprende un tampón. En realizaciones concretas, el tampón es un tampón glutamato, citrato, succinato, fosfato o acetato. En ciertas realizaciones, el tampón es tampón glutamato. En realizaciones concretas, el tampón es tampón glutamato en el intervalo de pH 3,0 a 6,0. En ciertas realizaciones, el tampón es tampón citrato. En varias realizaciones es tampón citrato en el intervalo de pH 2,0 a 7,5. En ciertas realizaciones, el tampón es tampón succinato. En varias realizaciones es tampón succinato en el intervalo de pH 3,0 a 7,0. En realizaciones concretas, el tampón es tampón fosfato. En ciertas realizaciones es tampón fosfato en el intervalo de pH 4,0 a 7,4. En varias realizaciones, el tampón es tampón acetato. En realizaciones concretas es
50 tampón acetato en el intervalo de pH 3,5 a 6,0.

55 En ciertas realizaciones, la proteína es autotamponadora. En realizaciones concretas, la proteína es autotamponadora y la acción autotamponadora de la proteína proporciona sustancialmente toda la capacidad de tamponamiento de la composición al pH deseado. En realizaciones concretas, la proteína es autotamponadora y tampona la composición en el intervalo de pH 4,5 a pH 7,0. A todos estos respectos, en ciertas realizaciones la acción autotamponadora de la proteína proporciona el 90 % o más de la capacidad de tamponamiento de la composición.

60 En muchas realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, la proteína es un agente para uso terapéutico humano o para uso veterinario. Adicionalmente, en realizaciones concretas, la proteína es un agente farmacéutico para uso terapéutico humano.

65 En ciertas realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, la adición del diluyente tiene como resultado una solución que comprende la proteína a aproximadamente 40 a 150 mg/ml, histidina de aproximadamente 7 a 50 mM, aproximadamente de 2 % a 4 % de manitol, aproximadamente de 1,0 a 2,5 % de sacarosa y aproximadamente de 0,004 % a 0,015 % de polisorbato 20 o polisorbato 80, con un pH de 4,5 a 7,5. En realizaciones concretas a este

respecto, la adición del diluyente tiene como resultado una solución que comprende la proteína a aproximadamente 40 a 150 mg/ml, histidina de aproximadamente 20 mM, aproximadamente 3,3 % de manitol, aproximadamente 2 % de sacarosa y aproximadamente 0,01 % de polisorbato 20 o polisorbato 80, con un pH de aproximadamente 5,0. En otras realizaciones concretas a este respecto, la adición del diluyente tiene como resultado una solución que comprende la proteína a aproximadamente 40 a 150 mg/ml, Tris de aproximadamente de 10mM a 20 mM, aproximadamente 2,0 % a 4,2 % de manitol, aproximadamente 0,5 % a 2,5 % de sacarosa, aproximadamente de 0,004 % a 0,015 % de polisorbato 20 o polisorbato 80, a pH 4,5 a 7.6. En otras realizaciones más a este respecto, la adición del diluyente tiene como resultado una solución que comprende la proteína a aproximadamente 40 a 60 mg/ml, Tris de aproximadamente 10 mM, aproximadamente 4 % de manitol, aproximadamente de 2 % de sacarosa, aproximadamente 0,004 % de polisorbato 20 o polisorbato 80, con un pH de aproximadamente 7,4. En otras realizaciones más a este respecto, la adición del diluyente tiene como resultado una solución que comprende la proteína a aproximadamente 40 a 60 mg/ml, Tris de aproximadamente 10 mM, aproximadamente 4 % de manitol, aproximadamente de 1 % de sacarosa, aproximadamente 0,004 % de polisorbato 20 o polisorbato 80, con un pH de aproximadamente 7,4.

Proteínas concretas y otros aspectos de las composiciones de acuerdo con la invención se describen con mayor detalle más adelante y en otros lugares del presente documento.

Procedimiento(s) de reconstitución

Las composiciones liofilizadas en varios aspectos y realizaciones de la invención se pueden reconstituir mediante diversos procedimientos, incluidos, por ejemplo, los procedimientos especificados por un fabricante y/o suministrador para reconstituir una composición farmacéutica liofilizada que comprende proteína para uso veterinario o humano. En la evaluación de varios parámetros de las composiciones como se indica en el presente documento, las instrucciones proporcionadas con un liofilizado son procedimientos preferidos para reconstitución. Asimismo, entre los procedimientos para reconstitución se encuentran los descritos más adelante y en otros lugares del presente documento.

Por ejemplo, las composiciones liofilizadas de acuerdo con el presente documento normalmente se pueden disponer en el interior de un vial de liofilización. Antes de la adición del diluyente, se deja equilibrar cada vial para reconstitución hasta la temperatura ambiente (normalmente la temperatura de la estancia). El tiempo de equilibrado dependerá de la temperatura inicial del liofilizado, la temperatura ambiente para el equilibrado, si el vial se agita, si el equilibrado se realiza mediante exposición al aire o a un baño de agua y otras condiciones. Un tiempo de equilibrado estándar para fines analíticos es una hora a temperatura ambiente y exposición al aire. El vacío en el vial, si se desea, se libera, normalmente insertando una aguja de calibre alto, tal como una aguja de de precisión de 25G a través del tabique. El diluyente, tal como agua estéril USP para irrigación, que también se ha equilibrado hasta la temperatura deseada, normalmente la temperatura ambiente, se introduce después en el vial mediante jeringuilla, de nuevo usando una aguja para perforar el tabique. En general se obtienen los mejores resultados introduciendo el diluyente sin tocar el liofilizado. Para la reconstitución en el momento adecuado se deberá iniciar un cronómetro en cuanto se comience a introducir el diluyente en el vial. Una vez que se ha introducido el volumen de diluyente deseado, el vial se agita suavemente durante aproximadamente 10 segundos, preferentemente 10 segundos.

Como se describe más adelante y en otros lugares del presente documento, la reconstitución se monitorizará en condiciones controladas con una intensidad conocida de luz incidente sobre la muestra, de nuevo fondos blanco uniforme y negro uniforme, como se describe más adelante y en otros lugares del presente documento. Junto con la inspección visible de este modo, se puede monitorizar la extensión hasta la cual la proteína se disuelve en el liofilizado, a menudo mediante absorbancia óptica a 280 nm (como se describe más adelante y en otros lugares del presente documento). El tiempo de reconstitución, medido mediante DO_{280} , se define, en ciertas realizaciones, como el tiempo en el que el 90 % más o menos 7,5 % de la proteína en el liofilizado se disuelve en el diluyente. Se determinan la altura de la espuma, las partículas, la turbidez y otros aspectos de la solución resultante y se miden como se describe más adelante y en otros lugares del presente documento.

B. Concentración de proteínas

Tras la adición de un diluyente y su reconstitución, las composiciones de acuerdo con varios aspectos y realizaciones de la invención proporcionan, entre otras cosas, soluciones de concentración elevada de proteínas liofilizadas. Por alta concentración a este respecto se quiere decir concentraciones de o superiores a 25 mg de proteína por ml de solución, preferentemente 40 mg/ml o superiores, especialmente preferentemente 50 mg/ml o superiores. Se ha de apreciar que hay muchas medidas de la concentración de proteínas que pueden ser útiles de acuerdo con la invención, incluidas, entre otras: (A) Porcentaje en peso (i) = peso del soluto por 100 unidades de volumen de disolvente; (B) Porcentaje en peso (ii) = peso del soluto por 100 unidades de volumen de la solución; (C) Porcentaje en peso (iii) = peso del soluto por 100 unidades del disolvente en peso; (D) Porcentaje en peso (iv) = peso del soluto por 100 unidades de la solución en peso; (E) Porcentaje en peso (v) = peso del soluto en cantidad de disolvente ("cs") suficiente para llevar el volumen total a 100 unidades; (F) Porcentaje en peso (vi) = peso del soluto en cantidad de disolvente suficiente para llevar el peso total a 100 unidades; (G) Porcentaje en masa = masa de soluto por 100 unidades de masa de la solución; (H) Fracción molar = moles de soluto por moles totales de todos los

componentes; (I) Molaridad = moles de soluto por litro de solución (es decir, soluto más disolvente); (J) Molalidad = moles de soluto por Kg de disolvente; y (K) molalidad en volumen = moles de soluto por litro de disolvente. No obstante, a efectos de simplicidad y claridad, las concentraciones de las proteínas en el presente documento se expresan como masa/volumen, normalmente mg/ml.

5

C. Reconstitución rápida

Los liofilizados, en una realización concreta adicional, se disuelven completamente y rápidamente en diluyentes adecuados. En ciertas realizaciones de la invención a este respecto, los liofilizados proteicos de la invención se disuelven completamente en 10 minutos o menos, en ciertas realizaciones preferidas 5 minutos o menos, en varias realizaciones particularmente preferidas 3 minutos o menos y en ciertas realizaciones muy particularmente preferidas 2 minutos o menos.

10

Por completamente disuelto a este respecto se quiere decir que está disuelto al menos el 90 % de la proteína en el liofilizado. En ciertas realizaciones preferidas a este respecto, el 90 % +/-10 % o más de la proteína está disuelto. En ciertas realizaciones particularmente preferidas, al menos el 97 % de la proteína está disuelto. Y en ciertas realizaciones especialmente preferidas de la invención a este respecto, sustancialmente toda la proteína está disuelta.

15

20 DO₂₈₀

Se pueden emplear varios procedimientos para determinar el grado de reconstitución de un liofilizado de acuerdo con este y con otros aspectos de la invención. Por ejemplo, como se trata adicionalmente más adelante, para una proteína (o proteínas) de coeficiente de extinción conocidos, presente en una cantidad conocida en un liofilizado y reconstituida en un volumen conocido de un diluyente, se puede determinar el grado de reconstitución midiendo la absorbancia óptica a 280 nm usando técnicas de rutina y bien conocidas. Las determinaciones de la densidad óptica de este tipo, por supuesto, serán efectuadas por todas las especies que contribuyen a la absorbancia a 280 nm en la solución reconstituida.

25

Dichos problemas a menudo se pueden sortear determinando la absorbancia óptica de la solución prelioofilización como valor de referencia por 100 % de reconstitución y, después, comparando el valor para el liofilizado reconstituido con este valor. Por supuesto, la comparación debe tener en cuenta cualquier diferencia entre el volumen que se ha liofilizado para fabricar el liofilizado y el volumen en el que se reconstituyó el liofilizado.

30

En una primera aproximación, la contribución del liofilizado seco al volumen de la solución que es el resultado de la reconstitución normalmente se puede ignorar, en cuyo caso se puede asumir que el volumen del liofilizado reconstituido es el mismo que el volumen de diluyente añadido. No obstante, cuando se requiere mayor precisión, el volumen total del liofilizado reconstituido deberá determinarse y usarse en el cálculo del grado de reconstitución, en lugar del volumen del diluyente añadido.

35

Con las dos consideraciones anteriores en cuenta, y manteniendo constantes otros aspectos de la determinación, la proporción de la absorbancia del liofilizado reconstituido y el patrón de referencia proporciona la reconstitución fraccional del liofilizado y, tras multiplicar por 100, el porcentaje de reconstitución.

40

Debe apreciarse que la precisión de las mediciones de la densidad óptica está limitada en la práctica de laboratorio de rutina y, en general, limita la precisión de las determinaciones de la reconstitución a más o menos 5 % de cualquier valor determinado concretamente. Debe tenerse cuidado para alcanzar una mejor precisión.

45

Inspección visual

Un procedimiento altamente preferido para determinar el grado de reconstitución de un liofilizado es la inspección visual en condiciones cuidadosamente controladas.

50

Entre los procedimientos preferidos para medir la altura de la espuma están los procedimientos de medición visual/manual, como los siguientes: El vial que contiene el liofilizado reconstituido se observa en ciertas condiciones cuidadosamente controladas. La intensidad de la luz en la muestra deberá ser de aproximadamente 2.000 lux. La solución se observará contra un fondo blanco no reflectante uniforme y un fondo negro no reflectante uniforme durante el periodo de tiempo adecuado.

55

Un fondo negro adecuado es uniformemente plano, uniformemente negro, uniformemente laminado no reflectante, tal como Home Depot UPC #724667060190 o un equivalente del mismo. Un fondo blanco adecuado es uniformemente plano, uniformemente blanco, uniformemente laminado no reflectante, tal como Home Depot UPC #724667074234 o un equivalente.

60

La muestra y las áreas de visualización deberán protegerse de la luz directa y, por tanto, deberán estar lo más ocultas posible, al menos por la parte inferior y tres laterales (aparte del panel trasero). Las muestras se visualizarán

65

de modo que el fondo para cada una sea completamente blanco o completamente negro.

Cabe destacar que la inspección visual es un procedimiento de control de la calidad bien establecido en la fabricación farmacéutica y, en concreto, en la producción de productos farmacéuticos, tales como liofilizados. En general, los procedimientos de inspección visual de productos farmacéuticos se han diseñado específicamente para que cumplan los requisitos especificados por la autoridad reguladora pertinente con la fabricación de fármacos, como la United States Food and Drug Administration ("USFDA") y están especificados en un protocolo de operaciones aprobados por la misma. Ciertos de estos protocolos aprobados por la USFDA para inspección visual de productos farmacéuticos se pueden usar de acuerdo con este aspecto de la invención divulgado en el presente documento.

D. Espuma, burrujas, efervescencia, turbidez y partículas

De acuerdo con varios aspectos y realizaciones de la invención a este respecto, en 10 minutos o menos de la adición de un diluyente adecuado, la solución resultante está sustancialmente libre de espuma, efervescencia, turbidez y formación de partículas y sedimentos fácilmente visibles. En ciertas realizaciones preferidas a este respecto, en un plazo de 10 minutos desde la adición del diluyente, la solución resultante está libre de espuma, efervescencia, turbidez y formación de partículas y sedimentos fácilmente visibles.

En ciertas realizaciones particularmente preferidas más de la invención a este respecto, en un plazo de 5 minutos o menos desde la adición del diluyente adecuado, la solución resultante está sustancialmente libre de espuma, efervescencia, turbidez y formación de partículas y sedimentos fácilmente visibles. En ciertas realizaciones especialmente particularmente preferidas a este respecto, en un plazo de 3,5 minutos desde la adición del diluyente, la solución resultante está libre de espuma, efervescencia, turbidez y formación de partículas y sedimentos fácilmente visibles.

1. Espuma. Al final de 10 minutos, preferentemente 5 minutos, más preferentemente 3 minutos y especialmente preferentemente 2 minutos, de acuerdo con realizaciones preferidas de la invención, a este respecto, la altura de la espuma es menor de 35 %, preferentemente 30 % o particularmente preferentemente 25 % o menor, muy particularmente preferentemente 20 % o menor, muy altamente particularmente preferentemente 15 % o menor, especialmente particularmente preferentemente 10 % o menor, muy especialmente particularmente preferentemente 5 % o menos de la altura de la espuma más la altura de la solución que es el resultado de la adición de un diluyente al liofilizado.

En cierta de las realizaciones preferidas a este respecto, el liofilizado se reconstituye con un volumen estándar de diluyente, tal como el diluyente y el volumen de diluyente recomendados por el fabricante. En ciertas realizaciones más preferidas a este respecto, el liofilizado se reconstituye en un contenedor de tamaño y forma estándar usado para producción del liofilizado farmacéutico, especialmente, por ejemplo, un vial del tipo usado para los liofilizados de etanercept.

Medición de la altura de la espuma

La altura de la espuma se puede medir de acuerdo con la invención mediante diversos procedimientos usando técnicas de rutina que son bien conocidas para los expertos en las técnicas a las que pertenece la invención.

Entre los procedimientos preferidos para medir la altura de la espuma están los procedimientos de medición visual/manual, como los siguientes: El vial que contiene el liofilizado reconstituido se observa en ciertas condiciones cuidadosamente controladas. La intensidad de la luz en la muestra deberá ser de aproximadamente 2.000 lux. La solución se observará contra un fondo blanco no reflectante uniforme y un fondo negro no reflectante uniforme.

Un fondo negro adecuado es uniformemente plano, uniformemente negro, uniformemente laminado no reflectante, tal como Home Depot UPC #724667060190 o un equivalente del mismo. Un fondo blanco adecuado es uniformemente plano, uniformemente blanco, uniformemente laminado no reflectante, tal como Home Depot UPC #724667074234 o un equivalente.

La muestra y las áreas de visualización deberán protegerse de la luz directa y, por tanto, deberán estar lo más ocultas posible, al menos por la parte inferior y tres laterales (aparte del panel trasero). Las muestras se visualizarán de modo que el fondo para cada una sea completamente blanco o completamente negro.

Con el contenedor iluminado de acuerdo con lo anterior, la altura de la espuma es la distancia entre la parte superior de la espuma y la interfaz entre la espuma y el líquido de debajo. La altura total se mide desde la parte superior de la espuma a la parte inferior del líquido de debajo (y, por tanto, es el total de la altura de la espuma más la altura del líquido de debajo). En una realización de la invención a este respecto, las alturas se miden de este modo usando compases.

2. Partículas. Al final de 10 minutos, preferentemente 5 minutos, más preferentemente 3 minutos, y especialmente preferentemente 2 minutos, de acuerdo con realizaciones preferidas de la invención a este respecto, las partículas en la formulación reconstituida se caracterizan porque hay pocas partículas visibles y/o partículas suspendidas que apenas disminuyen la claridad de la solución, preferentemente no hay partículas visibles pero las partículas suspendidas apenas disminuyen la claridad, igualmente preferentemente hay pocas partículas visibles pero las partículas suspendidas no tienen un efecto visible sobre la claridad y, más preferentemente, no hay partículas visibles y la solución es transparente.

La exploración visible de partículas se llevará a cabo en condiciones controladas adecuadas para inspección visual de productos farmacéuticos, como los descritos en otros lugares del presente documento.

3. Efervescencia. Al final de 10 minutos, preferentemente 5 minutos, más preferentemente 3 minutos, y especialmente preferentemente 2 minutos, de acuerdo con realizaciones preferidas de la invención a este respecto, no hay efervescencia visible. Más preferentemente no hay efervescencia como resultado de la reconstitución.

La evaluación visible de la efervescencia se llevará a cabo en condiciones controladas adecuadas para inspección visual de productos farmacéuticos, como los descritos en otros lugares del presente documento.

4. Burbujas. Al final de 10 minutos, preferentemente 5 minutos, más preferentemente 3 minutos, y especialmente preferentemente 2 minutos, de acuerdo con realizaciones preferidas de la invención a este respecto, hay burbujas visibles pero su número, tamaño y distribución no afectarán de forma perjudicial a la reconstitución, estabilidad o dosificación, preferentemente solo hay una o dos burbujas pequeñas visibles que no afectarán de forma perjudicial a la reconstitución, estabilidad o dosificación y, más preferentemente, no hay burbujas visibles.

La evaluación visible de las burbujas se llevará a cabo en condiciones controladas adecuadas para inspección visual de productos farmacéuticos, como los descritos en otros lugares del presente documento.

5. Turbidez. Al final de 10 minutos, preferentemente 5 minutos, más preferentemente 3 minutos, y especialmente preferentemente 2 minutos, de acuerdo con realizaciones preferidas de la invención a este respecto, hay turbidez pero reduce la transmitancia en menos del 20 %, preferentemente menos del 10 %, particularmente preferentemente menos del 5 %, especialmente preferentemente menos del 3 % y más especialmente preferentemente no hay turbidez visible.

La turbidez se puede medir de acuerdo con la invención usando técnicas de rutina bien conocidas e instrumentos ampliamente disponibles. Por ejemplo, la turbidez se puede medir usando un aparato Hach 2100 ANIS Laboratory Turbidimeter, usando habitualmente los parámetros siguientes: Auto Range -activada; Ration Option -desactivada; Unidades -UNT; Media de la señal -activada. El instrumento deberá haberse calibrado en el plazo de un mes y se usarán patrones de turbidez fiables (Cero y, por ejemplo, UNT 20) para iniciar el instrumento. Un conjunto de patrones adecuado es Hach StablCal Calibration Set N° de catálogo 26595-05 o equivalente.

La turbidez también se puede calibrar cualitativamente ocularmente usando condiciones de luz y visión cuidadosamente controladas, como se describe en otros lugares del presente documento, y patrones de turbidez adecuados para comparación. Otros procedimientos de rutina y bien conocidos para medir la turbidez también se pueden usar en la invención para este fin.

E. Área de superficie

Las composiciones de acuerdo con ciertos aspectos y realizaciones preferidas de la presente invención tienen un área de superficie tras la liofilización que es igual o mayor que cualquiera de 1,2, 1,3 o 1,4 m²/g; Entre las composiciones de acuerdo con ciertos aspectos y realizaciones preferidas de la a este respecto son las que tienen un área de superficie que es igual o mayor que cualquiera de 1,2, 1,3 o 1,4 m²/g; Entre otras composiciones adicionales a este respecto son aquéllas que tienen un área de superficie que es igual o mayor que cualquiera de 1,2, 1,3 o 1,4 m²/g e igual o menor que cualquiera de 1,5, 1,7, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, o 5,0 m²/g, incluida cualquier combinación de límites superiores e inferiores de la misma. Composiciones adicionales de acuerdo con ciertos aspectos y realizaciones adicionales a este respecto son aquéllas que tienen un área de superficie que es igual o mayor que cualquiera de 1,2, 1,3 o 1,4 m²/g e igual o menor que cualquiera de 1,5, 1,7, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, o 5,0 m²/g, incluida cualquier combinación de límites superiores e inferiores de la misma. Entre composiciones concretas a este respecto son aquéllas que tienen un área de superficie que es igual o mayor que 1,2 m²/g;

El área de superficie como se trata en el presente documento es una medida de la superficie accesible de una muestra a nivel molecular. El área de superficie de acuerdo con la invención a este respecto se puede determinar usando diversas técnicas de rutina que son bien conocidas para los expertos en las técnicas a las que pertenece la invención. Véase, por ejemplo, J.M. Smith, Chemical Engineering Kinetics, 3^a Ed., McGraw-Hill, Inc. (1981), especialmente el Capítulo 8, páginas 327-348, especialmente la Sección 8-1 "Determination of Surface Area," particularmente en las partes pertinentes a la determinación del área de superficie, volumen de poro, radios medios del poro y materia objeto relacionada.

Los procedimientos de medir el área de superficie con mayor frecuencia se basan en Brunauer, Emmet, Teller theory ("BET"); pero algunos también se basan en el modelo de Langmuir. (Véase las referencias anteriores). Se calcule usando los modelos BET o de Langmuir, las determinaciones del área de superficie para sólidos dispersados generalmente se basan en medir la cantidad de un agente que se une a una cantidad conocida del sólido. El agente normalmente es uno que se adhiere a las superficies en el sólido con una densidad molecular sustancialmente uniforme (es decir, moléculas por unidad de área de superficie), de modo que la cantidad del agente que se adhiere a la muestra proporciona una medida precisa de su área de superficie. Normalmente, el agente está en una forma que pueda alcanzar todas las superficies accesibles del sólido también, normalmente un gas.

Habitualmente, las áreas de superficie se miden mediante procedimientos generalmente de acuerdo con el resumen siguiente. Las muestras primero se liberan de impurezas adheridas, con mayor frecuencia mediante calentamiento, al vacío o "bajo" una corriente fluida de gas. Las muestras preparadas de este modo se enfrían después, normalmente en nitrógeno líquido. Una vez enfriadas, las muestras se exponen a un gas, normalmente nitrógeno o criptón, a una serie de presiones fijadas. Normalmente, el criptón se usa cuando se estima que el área de superficie es $2 \text{ m}^2/\text{g}$ o menos, como suele ser el caso para los liofilizados proteicos. Se mide la cantidad de gas absorbido a cada presión y el área de superficie de la muestra deriva de estas mediciones.

Procedimientos preferidos para medir el área de superficie de los liofilizados de acuerdo con varios aspectos y realizaciones de la invención a este respecto incluyen las determinaciones del área de superficie usando un sistema Micrometrics® ASAP 2020 Accelerated Surface Area and Porosimetry System de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Un procedimiento típico para medir el área de superficie de un liofilizado a este respecto es el siguiente. Aproximadamente de 50 a 200 miligramos de la torta liofilizada se mezclan completamente con una espátula de tamaño mini (que no altera la estructura de la torta) y se pesa en un tubo de fondo redondo. Usando el puerto de desgasificación en el ASAP 2020, se desgasifica la torta durante de 3 a 4 horas a una presión de 10 micrómetros y a 30°C . Después, la muestra se pesa con precisión. A continuación, se determina el área de superficie usando criptón y el puerto de la muestra del ASAP 2020. En general, de este modo se obtienen cinco puntos de datos y se calculan las áreas de superficie a partir de los datos usando la ecuación BET.

La Figura 5 muestra la relación entre las áreas de superficie BET para varias formulaciones relacionadas. Las áreas de superficie se determinaron de acuerdo con los anteriores. Las alturas de la espuma se determinaron como se ha descrito en otros lugares del presente documento.

35 F. Polimorfos y cristalinidad

La cristalinidad de los componentes de un liofilizado puede tener un efecto significativo sobre la conservación de la actividad proteica durante la liofilización y sobre la estabilidad de las proteínas en un liofilizado almacenado durante el tiempo. De acuerdo con esto, ciertos aspectos y realizaciones de la invención proporcionan composiciones y procedimientos para producir las composiciones en las que la aparición y/o distribución de los polimorfos de uno o más componentes en las mismas se optimizan para prevenir los daños proteicos y garantizar la integridad de las proteínas durante la liofilización, y para prevenir los daños en las proteínas y garantizar la integridad de las proteínas durante el almacenamiento, en particular tras el almacenamiento en estado liofilizado.

Los aspectos y realizaciones de la invención a este respecto se ilustran mediante optimización de los polimorfos de manitol en las composiciones. De acuerdo con esto, por ejemplo, en ciertas composiciones de la invención que comprenden manitol, además de un liofilizado proteico, el manitol es aproximadamente un 70 % delta manitol, no más de aproximadamente un 20 % manitol hidrato y no más de aproximadamente un 10 % manitol amorfo. En realizaciones preferidas a este respecto, más menos el error medio experimental al determinar las cantidades relativas de manitol hidratos en una muestra, el manitol en la composición liofilizada es al menos un 70 % delta manitol, no más de un 20 % manitol hidrato y no más de un 10 % manitol amorfo. Además, en varias otras realizaciones a este respecto, el manitol es al menos un 65, 60, 55, o 50 % delta manitol, no más de, respectivamente, un 12,5, 17,5, 22,5 o 27,5 % manitol hidrato y no más de, respectivamente, un 22,5, 27,5, 32,5 o 37,5 % manitol amorfo. (E decir: $\geq 65/\leq 12,5/\leq 22,5$; $\geq 60/\leq 17,5/\leq 27,5$; $\geq 55/\leq 22,5/\leq 32,5$; $\geq 50/\leq 7,5/\leq 37,5$, en la que / significa "y", y ";" separa conjuntos diferentes de parámetros que se aplican y todos los números son porcentajes). Más adelante se describen procedimientos para determinar polimorfos tales como, en concreto, polimorfos de manitol y sus distribuciones óptimas en una composición liofilizada.

La cristalinidad óptima se puede determinar usando varias técnicas bien conocidas, incluidas difracción en rayos X ("XRD"), FT-IR, calorimetría diferencial de barrido ("DSC") y espectroscopia de Raman. Véase, por ejemplo, Burger y col., "Energy/temperature Diagram and Compression Behavior of the Polymorphs of D-Mannitol," J. Pharm. Sci. 89(4): 457-468 (2000) sobre XRD, FT-IR, DSC y procedimientos de Raman a este respecto, Walter-Ley, L., "Crystallochimie-Sur les variétés cristallines du D-mannitol," C. R. Acad. Sci., Paris, Ser C. 267: 1779-1782 (1968) respecto a los procedimientos XRD methods, Izutso y col. "Effect of Mannitol Crystallinity on the Stabilization of Enzymes during Freeze Drying," Chem. Pharm. Bull. 42(10 5-8 (1994) respecto a XRD y DSC, y Vehring, R., "Red-Excitation Dispersive Raman Spectroscopy is a Suitable Technique for Solid-State Analysis of Respirable

Pharmaceutical Powders," Applied Spectroscopy 59(3) 286-292 (2005) respecto a la espectroscopia de Raman, particularmente en las partes pertinentes a XRD, FT-IR, DSC, y espectroscopia de Raman y su uso para determinar polimorfos en liofilizados, en particular de acuerdo con varios aspectos y realizaciones de la invención divulgados en el presente documento.

Cada una de estas técnicas tiene sus ventajas, además de algunas ventajas también. Usándolas para analizar estructuras en numerosas muestras para determinar las condiciones óptimas para liofilización puede ser una gran tarea, aunque no implica experimentación o esfuerzos indebidos. Además, los presentes procedimientos XRD, DSC y de Raman no pueden cuantificar con precisión ni discriminar ciertas estructuras.

Los inventores han desarrollado un procedimiento de espectroscopia de Raman cuantitativa en tiempo real para determinar polimorfos de los componentes liofilizados. El procedimiento usa un algoritmo de Mínimos Cuadrados Parciales ("PLS") para cuantificar los diferentes polimorfos de compuestos en una muestra. En contraste con los procedimientos de la técnica anterior, que dependen normalmente de frecuencias de "firma" individuales y pequeñas, y de patrones internos para distinguir y cuantificar las formas polimórficas de un compuesto, el procedimiento desarrollado por los presentes inventores usa un amplio espectro de Raman para cada polimorfo con el fin de distinguirlos unos de otros y de cuantificarlos sin que se requiera un patrón interno. Utilizando un espectro amplio para cada polimorfo y un algoritmo PLS para análisis se discrimina mejor entre polimorfos y mejora la precisión cuantitativa sobre los procedimientos de la técnica anterior. Además, dado que no requiere un patrón interno, el presente procedimiento evita errores sustanciales causados por la inestabilidad de los patrones internos y/o la no uniformidad en la distribución de un patrón interno en una muestra. El procedimiento se describe con mayor detalle más adelante y se ilustra mediante su aplicación al análisis de los polimorfos del manitol en liofilizados proteicos de concentración alta.

A modo de introducción, Vehring (citado en lo que antecede) mostró que los polimorfos del manitol cristalino se pueden distinguir entre sí y cuantificar usando un patrón interno, aunque con una precisión algo limitada, mediante frecuencias espectroscópicas de Raman. El uso de un patrón interno requirió la adición del patrón a la muestra y necesariamente incurrió en los inconvenientes mencionados anteriormente. Además, Vehring usó intensidades de picos únicos para la calibración y la intensidad, lo que necesariamente limitaba la capacidad del procedimiento para distinguir los polimorfos y su precisión cuantitativa.

Vehring identificó líneas de frecuencia concretas que difieren entre los polimorfos del manitol. Es decir, la contribución de los polimorfos se separó de los espectros de Raman de las muestras minimizando repetitivamente los residuos de los picos marcadores (es decir, las frecuencias de las líneas espectrales) seleccionados como firmas de los polimorfos individuales. Las frecuencias firma se seleccionaron analizando cada polimorfo por separado (o en una mezcla de componentes y proporciones conocidos). Dependiendo de una frecuencia de firma para cada polimorfo limita la capacidad del procedimiento para discriminar entre polimorfos y cuantificarlos.

El uso de espectroscopia de Raman para la determinación de polimorfos también se ha descrito en Roberts y col., "Quantitative Analysis of Mannitol Polymorphs: FT-Raman Spectroscopy," J. Pharma. Biomed. Analysis 28(6): 1135-1147 (2002) y en Auer y col., "Qualitative and quantitative study of polymorphic forms in drug formulations by near infrared FT-Raman spectroscopy," J. Molec. Structure 661: 307-317 (2003), particularmente en las partes pertinentes a la determinación de polimorfos en liofilizados de acuerdo con varios aspectos y realizaciones de la presente invención.

Por el contrario, el presente procedimiento usa un espectro de amplio rango para cada polimorfo para la discriminación y para la cuantificación. Los polimorfos se discriminan y cuantifican separando el espectro de la muestra usando un algoritmo de Mínimos Cuadrados Parciales. En resumen, el procedimiento implica: obtener un espectro de Raman para cada forma polimorfo sobre un amplio rango; normalizar los espectros de Raman contra su tira $-CH$ a aproximadamente 2.800 cm^{-1} ; derivar los espectros derivados para los espectros normalizados; simular de forma computacional un conjunto de espectros mediante adición lineal de los espectros derivados normalizados; generar un procedimiento de cuantificación usando el algoritmo de los Mínimos Cuadrados Parciales y el conjunto de calibración; y, después, aplicar el procedimiento al espectro de Raman de una muestra para calcular las cantidades relativas de los polimorfos en el mismo. (El análisis de Mínimos Cuadrados Parciales se describe en Wold, H., "The Fix Point Approach to Independent Systems, NorthHolland," Amsterdam (1981) y Geladi y col., "Partial Least-Squares Regression: A Tutorial," Anal. Chim. Acta 185: 1-17 (1986), en particular en las partes en las que los polimorfos del presente procedimiento se cuantifican mediante vectores de regresión que derivan de los espectros obtenidos de una muestra. Los vectores de regresión se generan a partir de variantes latentes seleccionadas usando una matriz espectral. La matriz se genera a partir de patrones de calibración: los vectores de regresión en convergencia generados a partir de la calibración se usan para predecir un conjunto de seudoprobabilidades a partir de los espectros de la muestra. La suma de las seudoprobabilidades para todas las identidades posibles para los espectros es igual a uno.

Por ejemplo, para manitol se usa un conjunto de espectros de Raman simulados para calibrar el programa PLS para calcular los vectores de regresión entre la matriz de los espectros de Raman y la matriz de los porcentajes para las cinco formas de manitol. Los espectros de calibración se generan mediante adición lineal de los espectros de

Raman procesados para cada polimorfo puro (en base a sus porcentajes). Este procedimiento evita el sesgo como varianza a partir de una distribución no uniforme e inestabilidad de los patrones de calibración en las muestras, problemas que rodean a los procedimientos tradicionales.

- 5 Se asume que las secciones transversales de Raman para todos los modos relacionados con las tiras C-H son iguales para todos los polimorfos y que la interacción entre los diferentes polimorfos es insignificante. Dada la primera suposición, los espectros normalizados para los polimorfos tendrán la misma intensidad de integración del modo C-H a 2800 cm^{-1} . Dada la primera suposición, la integral del pico de 2800 cm^{-1} ajustará la relación entre la intensidad del pico de Raman y el porcentaje de cada polimorfo en la muestra. Dada la segunda suposición, el espectro de Raman de los polimorfos en una muestra será la adición lineal de los espectros de Raman de los polimorfos individuales en la muestra. El factor de regresión se obtiene a partir de segundos espectros derivados normalizados. La normalización elimina el error que sería producido por una fluctuación del pico absoluto. El uso de segundos espectros derivados reduce el efecto de la intensidad de fondo de Raman.
- 10
- 15 De acuerdo con varias realizaciones del presente procedimiento, los efectos del desplazamiento de rejilla se pueden eliminar usando el algoritmo de corrección del desplazamiento de rejilla. Los algoritmos de corrección típicos a este respecto se basan en un valor de desplazamiento medido que se usa para obtener el valor de píxel corregido mediante, por ejemplo, un ajuste de curva lineal a los dos puntos de datos adyacentes. El valor de desplazamiento se puede obtener a partir de mediciones de los espectros de Raman de dos patrones, tales como neón y acetaminógeno, tomados en dos condiciones con los mismos parámetros. Con el fin de filtrar la varianza asociada con la intensidad del pico absoluto y el fondo espectral se obtienen segundos espectros de Raman derivados normalizados para ambos patrones. El ajuste de la curva lineal se basa en dos puntos de datos consecutivos. El valor de desplazamiento obtenido de las etapas anteriores da el valor de píxel corregido de los espectros desplazados en bruto.
- 20

25 G. Proteínas.

- La invención divulgada en el presente documento se puede poner en práctica con casi cualquier proteína. En particular, es aplicable a proteínas de significación terapéutica en aplicaciones terapéuticas de uso veterinario y/o humano. Los procedimientos y formulaciones específicos de la invención que atañen a cualquiera de estas proteínas concretas a menudo serán genéricas; pero, en muchos casos, también pueden ser únicas. En concreto, las proteínas que no son solubles en agua y aquéllas que forman espontáneamente agregados insolubles en agua pueden no ser adaptables a los procedimientos generales de la presente invención divulgados en el presente documento y pueden requerir procedimientos especializados para adaptarlos a los presentes procedimientos.
- 30
- 35 Asimismo, las proteínas susceptibles a una pérdida irreversible de actividad cuando se han desecado (como mediante liofilización) también pueden requerir procedimientos especializados para usar en la presente invención. El desarrollo de dichos procedimientos, aunque puede requerir una experimentación significativa, deberá efectuarse muy considerablemente mediante la información proporcionada en el presente documento y los conocimientos de las características estructurales de las proteínas que producen insolubilidad y/o agregación. Por tanto, estará dentro de la experiencia en la técnica desarrollar dichos procedimientos a la luz de las guías proporcionadas en el presente documento sin experimentación indebida.
- 40

- Aunque se puede utilizar casi cualquier proteína de acuerdo con la invención divulgada en el presente documento, se prefieren ciertos tipos de proteínas. En concreto, se prefieren las proteínas con una buena solubilidad en agua y aquéllas que no tienen una fuerte propensión espontánea a formar agregados insolubles.
- 45

Las proteínas preferidas de la invención incluyen aquéllos que son un agente farmacéutico terapéutico veterinario o humano, especialmente agentes farmacéuticos terapéuticos.

- 50 Las proteínas preferidas de la invención incluyen, particularmente, proteínas que se unen de forma selectiva a dianas específicas, incluidas proteínas de unión a ligando y los ligandos de las proteínas. Las proteínas de unión a antígeno, proteínas derivadas de las mismas y las proteínas relacionadas con las mismas están entre las realizaciones de la invención a este respecto particularmente preferidas. Las proteínas altamente preferidas de la invención a este respecto son anticuerpos y proteínas derivados de anticuerpos o que incorporan anticuerpos, en su totalidad o en parte, incluidos, por nombrar solo algunas de estas entidades: Anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos sometidos a ingeniería genética, anticuerpos híbridos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos alterados genéticamente, incluidos los anticuerpos con una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos (luteínas de anticuerpos), anticuerpos quiméricos, derivados de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, que pueden proceder de cualquiera de los anteriores y también pueden ser derivados de los mismos sometidos a ingeniería o modificados, proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo o un resto derivado de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo, que puede ser cualquiera de los anteriores o una modificación o derivado del mismo, conjugados que comprenden un anticuerpo o un resto derivado de un anticuerpo, incluido cualquiera de los anteriores, o modificaciones o derivados de los mismos, y anticuerpos modificados químicamente, fragmentos de anticuerpos, proteínas de fusión de anticuerpos y similares, incluidos todos los anteriores.
- 55
- 60
- 65

Restos de unión a ligando a este respecto especialmente preferidos son los restos de unión a TNF del receptor de TNF, especialmente los restos de unión a TNF alfa de los receptores del TNF alfa, en particular aquéllos de un receptor de TNF alfa humano, más especialmente el resto de unión a TNF en etanercept.

5 Ligandos especialmente preferidos a este respecto son antagonistas del receptor de IL-1 que se unen a los receptores de IL-1. Especialmente altamente preferido a este respecto es el antagonista de IL-1 IL-1-ra y proteínas derivadas del mismo u homólogos funcionales del mismo.

10 Muy especialmente altamente preferidos a este respecto son los restos antagonistas del receptor de IL-1 derivados de IL-1 ra. En particular, la secuencia polipeptídica derivada de IL-1-ra de Fc-IL-1-ra es muy altamente especialmente particularmente preferida en ciertas realizaciones de la invención a este respecto.

15 Entre las proteínas más altamente preferidos de la invención a este respecto son las proteínas de fusión TNFR-Fc y las proteínas de fusión IL-1-ra-Fc. Entre las realizaciones más altamente preferidas a este respecto son etanercept y Fc-IL-1 ra.

También entre las proteínas preferidas de la invención a estos respectos son las que se describen más adelante.

20 1. Anticuerpos y proteínas relacionadas con los anticuerpos

Entre las proteínas particularmente preferidas de acuerdo con la invención son polipéptidos de anticuerpos, tal como los polipéptidos de las cadenas pesada y ligera que tienen la misma secuencia de aminoácidos que aquéllas que se producen y forman anticuerpos naturales, tales como los que se producen en sueros y antisueros, incluidos los polipéptidos y proteínas aislados de fuentes naturales, así como las formadas por tecnologías de hibridoma, mediante activación de un gen endógeno (mediante, por ejemplo, recombinación homóloga o no homóloga), mediante expresión de un gen exógeno bajo el control de una región endógena de control de la transcripción, mediante expresión de una construcción de expresión exógena, mediante semisíntesis y mediante síntesis de novo, por citar algunas técnicas empleadas habitualmente para fabricar anticuerpos y polipéptidos y proteínas relacionados con anticuerpos que se pueden usar para producir polipéptidos y proteínas de anticuerpos de acuerdo con la invención.

35 Incluidos entre estos polipéptidos y proteínas relacionados con anticuerpos son aquéllos que en su totalidad o en parte tienen una secuencia de aminoácidos de novo, los que comprenden todas o una o más partes de un anticuerpo (es decir: Una cadena continua de aminoácidos que tiene la misma secuencia que cualquiera de cuatro o más residuos en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de anticuerpo natural), aquéllos que tienen una secuencia de aminoácidos que corresponde de algún modo a la de un anticuerpo natural, pero difiere del mismo en otros modos, aquéllos que tienen las mismas pero diferentes secuencias de aminoácidos como un homólogo o secuencia natural relacionadas con los mismos, pero difieren del homólogo en una o más modificaciones postraduccionales y los compuestos en parte por cualquiera de los anteriores (en parte o en su totalidad) condensados con una o más regiones polipeptídicas que pueden ser o derivar o estar relacionadas con un segundo polipéptido de anticuerpo diferente y puede ser o derivar de cualquier otro polipéptido o proteína, natural, similar pero diferente, que tiene una secuencia de aminoácidos semi-de novo y/o una secuencia de novo, entre otras. En general, dichos híbridos se denominan en el presente documento polipéptidos de fusión y/o proteínas de fusión.

45 Además, entre las proteínas preferidas de acuerdo con la invención descritos en el presente documento son proteínas modificadas de acuerdo con todos los anteriores. Incluidas entre dichas proteínas modificadas están las proteínas modificadas químicamente mediante un enlace no covalente, un enlace covalente o ambos, un enlace covalente y no covalente. También se incluyen todos los anteriores que comprenden además una o más modificaciones postraduccionales que pueden realizarse mediante sistemas de modificación celular o modificaciones introducidas ex vivo mediante procedimientos enzimáticos y/o químicos, o introducidos de otros modos.

50 Entre las proteínas preferidas de la invención a este respecto están los fragmentos Fab, tales como los producidos mediante escisión de un anticuerpo (LH)₂ dimérico polimérico con cierta proteasa que dejan la cadena ligera intacta al tiempo que escinden las cadenas pesadas entre la región variable y la región constante adyacente, "anteriormente" los enlaces disulfuro que mantienen unidas las cadenas pesadas. Dicha escisión libera un fragmento Fc que comprende las porciones restantes de las cadenas pesadas unidas entre sí y dos fragmentos Fab diméricos, en el que cada uno comprende una cadena ligera intacta t la región variable de la cadena pesada. Los fragmentos Fab también se pueden producir mediante otras técnicas que no requieren aislamiento de un anticuerpo natural y/o escisión con una proteasa.

60 También se prefieren los fragmentos Fab₂, tales como los producidos en gran medida del mismo modo que los fragmentos Fab usando una proteasa que escinden "entre o debajo" de los enlaces disulfuro. Como resultado, los dos fragmentos Fab se mantienen unidos mediante uniones disulfuro y se liberan como un único fragmento Fab₂. Los fragmentos Fab₂ se pueden producir mediante muchas otras técnicas, incluidas las que no requieren aislamiento de un anticuerpo intacto o escisión con una proteasa que tiene la especificidad requerida. Además, los fragmentos Fab₂ mono o biespecíficos ahora se pueden fabricar mediante diversas técnicas rutinarias.

También entre las proteínas preferidas a este respecto se encuentran los fragmentos Fab₃, que son fragmentos de anticuerpos sometidos a ingeniería en los que los fragmentos Fab están unidos. Los fragmentos Fab₃ pueden ser mono, bi o trispecíficos. Pueden fabricarse de diversos modos bien conocidos para los expertos en las técnicas pertinentes.

5 Entre otras proteínas preferidas a este respecto están los fragmentos Fc, como los producidos mediante escisión con una proteasa del mismo modo usado para la producción de fragmentos Fab o de fragmentos Fab₂. No obstante, para la producción de fragmentos Fc, se aíslan los fragmentos que contienen la cadena pesada dimérica en lugar de los fragmentos que contienen la cadena ligera. Los fragmentos Fc carecen de sitios de combinación antigénica, pero
10 comprenden regiones efectoras que desempeñan un papel en procesos fisiológicos que implican anticuerpos. Los fragmentos Fc pueden fabricarse mediante diversas técnicas que son bien conocidas y se emplean de forma rutinaria por los expertos en la técnica para este fin.

15 Entre otras proteínas preferidas a este respecto son fragmentos variables monocatenarios ("scFv(s)"). Los scFv(s) son proteínas de fusión formadas uniendo las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de una inmunoglobulina. Normalmente, las cadenas pesada y ligera en un scFv están unidas por un corto enlazador de serina, glicina. Los scFv(s) tienen la misma especificidad que los anticuerpos de los que derivan. Inicialmente producidas mediante expresión en fagos, los scFv(s) se pueden producir mediante diversos procedimientos muy
20 conocidos.

También se prefieren los Bis-scFv(s) que son fusiones de dos scFv(s). Los fragmentos Bis-scFv(s) pueden ser mono o biespecíficos. Se conocen diversos procedimientos y se pueden aplicar para fabricar Bis-scFv(s) de acuerdo con la invención.

25 También se prefieren de acuerdo con la invención a este respecto los minicuerpos, diacuerpos mono o biespecíficos, triacuerpos mono, bi y trispecíficos; tetracuerpos mono, bi, tri y tetraespecíficos, dominios VH, dominios V-NAR, dominios V_H, dominios V_L, Ig de camello, NAR de Ig y otros.

También entre realizaciones preferidas de acuerdo con varios aspectos y realizaciones preferidas de la invención a
30 estos y otros aspectos son proteínas que comprenden una o más CDR y/o regiones derivadas de CDR y/o relacionadas con CDR de un anticuerpo o una o más regiones FR y/o derivadas de FR y/o relacionadas con FR de un anticuerpo. A este respecto, CDR significa región determinante de la complementariedad; es decir, una región hipervariable de una cadena ligera o pesada de un anticuerpo, normalmente de aproximadamente 9 a 12 aminoácidos de longitud que normalmente es parte importante de un resto de unión específico de antígeno de un anticuerpo. FR a este respecto significa una región estructural de un anticuerpo; es decir, una región de
35 aproximadamente 15 a 20 aminoácidos que separa las CDR en el resto de unión específico de antígeno de un anticuerpo. Las expresiones derivados de CDR y relacionados de CDR y los términos derivados de FR y relacionados con FR tienen los mismos significados que CDR y DR, respectivamente, como se indica en el glosario anterior para las expresiones derivados de anticuerpo y relacionados co anticuerpos como el término anticuerpo.

40 Con respecto a anticuerpos, proteínas derivadas de anticuerpos y relacionadas con anticuerpos de acuerdo con lo anterior y con otros aspectos de la invención divulgados en el presente documento, véase, por ejemplo, Protein Engineering: Principles and Practice, Jeffrey L. Cleland and Charles S. Craik, eds. Wiley-Liss, Inc., New York (1996), en particular en Kelley, Robert F., "Engineering Therapeutic Antibodies," Chapter 15, pp. 399-434 y Hollinger, P. &
45 Hudson, P., "Engineered antibody fragments and the rise of single domains," Nature Biotechnology, September 2005, 1126-1136, particularmente en las partes pertinentes a la estructura e ingeniería de los anticuerpos, en particular anticuerpos biofarmacéuticos, y proteínas derivadas de anticuerpos y relacionadas con anticuerpos, en particular derivadas de anticuerpos y anticuerpos.

50 En lo que respecta a todo lo anterior, particularmente preferidas en la invención son proteínas humanas, humanizadas y de otro tipo que no generan una respuesta inmunitaria significativamente perjudicial cuando se administra a un ser humano. En la invención también se prefieren proteínas de acuerdo con todo lo anterior que no producen de forma simular una respuesta significativamente perjudicial al administrarlo a seres no humanos.

55 Entre proteínas muy particularmente preferidas de acuerdo con la invención a estos aspectos son proteínas de fusión que comprenden anticuerpos y/o proteínas, polipéptidos o fragmentos derivados de anticuerpos o similares, incluidos todos los descritos anteriormente. Entre las proteínas de fusión particularmente preferidas de la invención a este respecto son las proteínas de fusión que comprenden un fragmento o una proteína o fragmento derivado de anticuerpo como las descritas anteriormente y un resto de unión a ligando, como los que se describen de forma
60 ilustrativa en el presente documento.

2. Proteínas de unión a la diana.

65 Asimismo, entre las proteínas preferidas de la invención a este respecto son anticuerpos y otros tipos de proteínas de unión a la diana y proteínas relacionadas o derivadas, y ligandos de proteínas, y proteínas derivadas o relacionadas. Entre las proteínas de unión a ligando especialmente preferidas a este respecto son proteínas que se

unen a proteínas señal y efectoras, y proteínas relacionadas con las mismas o derivadas de las mismas.

Entre estas proteínas de unión, incluidos anticuerpos, incluidas proteínas derivadas de las mismas y proteínas relacionadas con las mismas, se encuentran las que se unen a uno o más de los siguientes, solas o en cualquier combinación:

- (a) proteínas CDR que incluyen, entre otras, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 y CD34;
- (b) proteínas de la familia del receptor HER, incluidos, por ejemplo, el receptor HER2, HER3, HER4 y EGF;
- (c) moléculas de adhesión celular, por ejemplo LFA-1, Mol, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM y alfa v/beta 3 integrina;
- (d) factores de crecimiento, incluidos, entre otros, por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular ("VEGF"); hormona de crecimiento, hormona estimulante del tiroides, hormona estimulante de los folículos, hormona luteinizante, factor de liberación de la hormona de crecimiento, hormona paratiroidea, sustancia de inhibición mulleriana, proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alpha), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento neural, tal como NGF-beta, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factores de crecimiento de fibroblastos, incluidos, por ejemplo; aFGF y bFGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factores transformantes del crecimiento (TGF), incluidos, entre otros, TGF-alfa y TGF-beta, incluidos TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGFbeta4 o TGF-beta5, factores de crecimiento similares a la insulina I y II (IGF-I y IGF-II), des(1-3)-IGF-1 (IGF-I cerebral) y factores de osteoinducción;
- (e) insulinas y proteínas relacionadas con la insulina, incluidas, entre otras, la cadena A de la insulina, la cadena B de la insulina, la proinsulina y las proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina;
- (f) coagulación u proteínas relacionadas con la coagulación, tales como, entre otros, el factor VIII, el factor tisular, el factor de von Willebrand, la proteína C, la alfa1-antitripsina, los activadores del plasminógeno, tales como la uroquinasa y el activador del plasminógeno tisular ("t-PA"), la bombazina, la trombina y la trombopoyetina;
- (g) los factores estimulantes de las colonias (CSF), incluidos, entre otros, los siguientes, M-CSF, GM-CSF, y G-CSF;
- (h) otras proteínas de la sangre y el suero, incluidas, entre otras, albúmina, IgE y antígenos de grupo de la sangre;
- (i) receptores y proteínas asociadas a los receptores, incluidas, por ejemplo, el receptor flk2/flt3, el receptor de la obesidad (OB), los receptores de la hormona de crecimiento y los receptores de los linfocitos T;
- (j) factores neurotróficos, incluidos, entre otros, el factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF) y la neurotrofina-3, -4, -5, o -6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6);
- (k) la cadena A de la relaxina, la cadena B de la relaxina y la prorelaxina;
- (l) interferones, incluidos, por ejemplo, interferón alfa, beta y gamma;
- (m) interleuquinas (IL), por ejemplo IL-1 a IL-10;
- (n) antígenos virales, incluido, entre otros, un antígeno viral de la cubierta del SIDA;
- (o) lipoproteínas, calcitonina, glucagón, factor natriurético atrial, tensioactivo pulmonar, factor de necrosis tumoral alfa y beta, encefalina, RANTES (regulada en la activación de los linfocitos T expresados y secretados con normalidad), péptido asociado con la gonadotropina de ratón, ADNasa, inhibina y activina;
- (p) integrina proteína A o D, factores reumatoides, inmunotoxinas, proteína morfogenética ósea (BMP), superóxido dismutasa, proteínas de superficie de membrana, factor acelerante del desarrollo (DAF), proteínas de transporte y de la cubierta del SIDA, receptores domésticos, adhesinas, proteínas reguladoras, inmunoadhesinas, anticuerpos; y
- (q) fragmentos o variantes biológicamente de cualquiera de los anteriores.

En lo que respecta a lo anterior, particularmente preferidos son los que son agentes terapéuticos eficaces, particularmente aquéllos que ejercen un efecto terapéutico mediante la unión a una diana entre los indicados anteriormente, incluidas las dianas derivadas de las mismas, las dianas relacionadas con las mismas y las modificaciones de las mismas.

3. Proteínas ilustrativas concretas

Entre las proteínas ilustrativas concretas se encuentran ciertas proteínas de anticuerpos y relacionadas con anticuerpos, incluidos pepticuerpos tales como, por ejemplo, los indicados inmediatamente a continuación y en otros lugares del presente documento:

anticuerpos y pepticuerpos específicos de OPGL y similares (también denominados anticuerpos específicos de RANKL, pepticuerpos y similares), incluidos anticuerpos específicos de OPGL completamente humanizados y humanos, particularmente anticuerpos monoclonales completamente humanizados, incluidos, entre otros, los anticuerpos descritos en la publicación internacional número WO 03/002713, en relación con los anticuerpos específicos de OPG y proteínas relacionadas con anticuerpos; en particular los que tienen las secuencias indicadas en el mismo, en particular, entre otras, las indicadas en el mismo: 9H7; 18B2; 208; 2E11; 16E1; y 22B3, incluidos los anticuerpos específicos de OPG que tienen la cadena ligera de la SEC ID N° 2 como se indica en la Figura 2 y/o la cadena pesada de la SEC ID N° 4, como se indica en el mismo en la Figura 4.

5 Los agentes de unión a miostatina o peptidocuerpos, incluidos los peptidocuerpos específicos de la miostatina, en particular los descritos en la publicación de solicitud de EE.UU. número 2004/0181033, en particular en las partes pertinentes a los peptidocuerpos específicos de la miostatina, incluidos, entre otros, los peptidocuerpos de la familia del mTN8-19, incluidos los de las SEC ID N° 305-351, incluidos el TN8-19-1 a TN8-19-40, TN8-19 con1 y TN8-19 con2; peptidocuerpos de la familia mL2 de las SEC ID N° 439-446; la familia mL21 de las SEC ID N° 447-452; la familia mL24 de las SEC ID N° 453-454; y los de las SEC ID N° 615-631.

10 Los anticuerpos específicos del receptor de IL-4, en particular los que inhiben las actividades mediadas por la unión de la IL-4 y/o la IL-13 al receptor, incluidos los descritos en la publicación internacional n° WO 2005/047331 de la solicitud internacional número PCT/US2004/03742, en particular en las partes pertinentes a anticuerpos específicos del receptor de la IL-4, en particular los anticuerpos como se describen en las mismas, en particular, y sin limitaciones, los designados en el mismo: L1H1; L1H2; L1H3; L1H4; L1H5; L1H6; L1H7; L1H8; L1H9; L1H10; L1H11; L2H1; L2H2; L2H3; L2H4; L2H5; L2H6; L2H7; L2H8; L2H9; L2H10; L2H11; L2H12; L213; L2H14; L3H1; L4H1; L5H1; L6H1.

15 Los anticuerpos específicos del receptor 1 de la interleuquina 1 ("IL-1-R1"), peptidocuerpos y proteínas relacionadas y similares, incluidos, entre otros, los descritos en el número de publicación de la solicitud de EE.UU. US2004/097712A1 en las partes pertinentes a las proteínas de unión específicas de IL-1-R1, anticuerpos monoclonales en particular, especialmente, sin limitaciones, los designados en el mismo: 15CA, 26F5, 27F2, 24E12 y 10H7.

25 Los anticuerpos y peptidocuerpos específicos de Ang2 y proteínas relacionadas y similares, incluidos, entre otros, los descritos en la publicación internacional número WO 03/057134 y la publicación de solicitud de EE.UU. número US2003/0229023, en particular en las partes pertinentes a los anticuerpos y peptidocuerpos específicos de Ang2 y similares, especialmente los de las secuencias descritas en la misma, incluidas, entre otras: L1(N); L1(N) WT; L1(N) 1K WT; 2xL1(N); 2xL1(N) WT; Con4 (N), Con4 (N) 1K WT, 2xCon4 (N) 1K; L1(C); L1(C) 1K; 2xL1 (C); Con4 (C); Con4 (C) 1K; 2xCon4 (C) 1K; Con4-L1 (N); Con4-L1 (C); TN-12-9 (N); C17 (N); TN8-8(N); TN8-14 (N); Con 1 (N), incluidos los anticuerpos anti-Ang 2 y formulaciones como las descritas en la publicación internacional número WO 2003/030833 particularmente Ab526; Ab528; Ab531; Ab533; Ab535; Ab536; Ab537; Ab540; Ab543; Ab544; Ab545; Ab546; A551; Ab553; Ab555; Ab558; Ab559; Ab565; AbF1 AbFD; AbFE; AbFJ; AbFK; AbG1D4; AbGC1 E8; AbH1 C12; AbIA1; AbIF; AbIKAbIP; y AbIP, en sus diversas permutaciones tal como se describe en el mismo.

30 Los anticuerpos específicos de NGF, incluidos, en concreto, los descritos en la publicación de solicitud de EE.UU. número US2005/0074821, en particular los anticuerpos específicos de NGF y proteínas relacionadas a este respecto, incluidos, en concreto, entre otros, los anticuerpos específicos de NGF designados 4D4, 4G6, 6H9, 7H2, 14D10 y 14D11.

35 Los anticuerpos específicos de CD22 y proteínas relacionadas, como los descritos en el documento US 5,789,554, particularmente anticuerpos específicos de CD22 humanos, tales como, entre otros, los anticuerpos humanizados y completamente humanos, incluidos, entre otros, los anticuerpos monoclonales humanizados y completamente humanos, en particular incluidos, entre otros, los anticuerpos IgG específicos de CD22 humanos, tales como, por ejemplo, un dímero de una cadena gamma hLL2 monoclonal de ratón-humana unida por puentes disulfuro a una cadena kappa hLL2 monoclonal de ratón-humana, incluido, entre otros, por ejemplo, el anticuerpo completamente humanizado específico de CD22 humano de Epratuzumab, número de registro CAS 501423-23-0.

40 Los anticuerpos específicos del receptor de IGF-1 y proteínas relacionadas como los descritos en la solicitud de patente internacional número PCT/US2005/046493, respecto a los anticuerpos específicos del receptor de IGF-1 y proteínas relacionadas, incluidos, entre otros, los anticuerpos específicos de IGF-1 designados en la misma L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13, L14H14, L15H15, L16H16, L17H17, L18H18, L19H19, L20H20, L21H21, L22H22, L23H23, L24H24, L25H25, L26H26, L27H27, L28H28, L29H29, L30H30, L31H31, L32H32, L33H33, L34H34, L35H35, L36H36, L37H37, L38H38, L39H39, L40H40, L41H41, L42H42, L43H43, L44H44, L45H45, L46H46, L47H47, L48H48, L49H49, L50H50, L51 H51 y L52H52.

45 Los anticuerpos específicos de la proteína 1 relacionada con B-7 ("B7RP-1") (B7RP-1 también se denomina en la literatura B7H2, ICOSL, B7h, y CD275), en particular los anticuerpos IgG2 monoclonales completamente humanos específicos de B7RP, particularmente el anticuerpo monoclonal IgG2 completamente humano que se une a un epítipo en el primer dominio similar a la inmunoglobulina de B7RP-1, especialmente los que inhiben la interacción de B7RP-1 con su receptor natural, ICOS, sobre los linfocitos T activados en concreto, especialmente en todos los anteriores respectos, los divulgados en el número de solicitud provisional de EE.UU. 601700,265, presentada el 18 de julio de 2005, respecto a dichos anticuerpos y proteínas relacionadas, incluidos, entre otros, los anticuerpos designados en la misma del siguiente modo: 16H (que tiene secuencias variables de la cadena ligera y secuencias variables de la cadena pesada SEC ID N° 5 y SEC ID N° 7 respectivamente en la misma); 50 (que tiene las secuencias variables de la cadena ligera y las secuencias variables de la cadena pesada SEC ID N° 2 y SEC ID N° 9, respectivamente en la misma); 2H (que tiene las secuencias variables de la cadena ligera y las secuencias variables de la cadena pesada SEC ID N° 3 y SEC ID N° 10 respectivamente en la misma); 43H (que tiene las secuencias variables de la cadena ligera y las secuencias variables de la cadena pesada SEC ID N° 6 y SEC ID N°

14 respectivamente en la misma); 41 H (que tiene las secuencias variables de la cadena ligera y las secuencias variables de la cadena pesada SEC ID N° 5 y SEC ID N° 13 respectivamente en la misma); y 15H (que tiene las secuencias variables de la cadena ligera y las secuencias variables de la cadena pesada SEC ID N° 4 y SEC ID N° 12, respectivamente).

5 Los anticuerpos específicos de la IL-15, pepticuerpos y proteínas relacionadas, tales como, en particular, los anticuerpos monoclonales humanizados, particularmente los anticuerpos como los divulgados en la publicación de solicitud de EE.UU. Números US2003/0138421; US2003/023586; y US2004/0071702 en lo que respecta a los anticuerpos específicos de IL-15 y proteínas relacionadas, incluidos pepticuerpos, incluidos, particularmente, por ejemplo, entre otros, anticuerpos HuMax IL-15 y proteínas relacionadas, tales como, por ejemplo, 146B7.

15 Los anticuerpos específicos del IFN gamma, especialmente los anticuerpos específicos del IFN gamma humano, en particular los anticuerpos específicos del IFN gamma completamente humanos, tales como, por ejemplo, los descritos en la publicación de solicitud de EE.UU. número US2005/0004353 en lo que respecta a los anticuerpos específicos del IFN gamma, en particular, por ejemplo, los anticuerpos designados en la misma 1118;1118*;1119;1121; y 1121*.

20 Los anticuerpos específicos de TALL-1 y otras proteínas de unión específicas de TALL tales como los descritos en la publicación de solicitud de EE.UU. número 2003/0195156 en lo que respecta a las proteínas de unión TALL-1, en particular las moléculas de las Tablas 4 y 5B.

25 El/los factor/es de células madre ("SCF") y proteínas relacionadas como los descrito en las patentes de EE.UU. números 6,204,363 y 6,207,802, en lo que respecta a factores de células madre y proteínas relacionadas, en particular, por ejemplo, el factor de células madre "STEMGENTM".

Los ligandos de Flt3 ("Flt3L") y proteínas relacionadas como los descritos en la patente de EE.UU. número 6.632.424 en lo que respecta a ligandos de Flt3 y proteínas relacionadas a este respecto.

30 Los receptores de IL-17 y proteínas relacionadas ("IL-17R"), como los descritos en la patente de EE.UU. número 6.072.033 en lo que respecta a ligandos de Flt3 y proteínas relacionadas a este respecto.

Etanercept, también denominado Enbrel, y proteínas relacionadas.

35 Actimmune (Interferón-gamma-1 b), Activase (Alteplasa), Aldurazme (Laronidasa), Amevive (Alefacept), Avonex (Interferón beta-1a), BenefIX (Nonacog alfa), Beromun (Tasonermina), Beatseron (Interferón-beta-1 b), BEXXAR (Tositumomab), Tev-Tropin (Somatropina), Bioclato o RECOMBINATE (Recombinante), CEREZME (Imiglucerasa), ENBREL (Etanercept), Eprex (epoyetina alfa), EPOGEN/Procit (Epoyetina alfa), FABRAZYME (Agalsidasa beta), Fasturtecl Elitek ELITEK (Rasburicasa), FORTEO (Teriparatida), GENOTROPIN (Somatropina), GlucaGen (Glucagón), Glucagon (Glucagón, origen ADNr), GONAL-F (folitropina alfa), KOGENATE FS (Octocog alfa), HERCEPTIN (Trastuzumab), HLT-MATROPE (SOMATROPINA), HLTMIRA (Adalimumab), Insulina en Solución, INFERGEN[®] (Interferón alfacon-1), KINERET[®] (anakinra), Kogenate FS (factor antihemofílico), LEUKIN (SARGRAMOSTIM factor estimulante de las colonias de granulocitos-macrófagos humano recombinante (rhuGM-CSF), CAMPATH (Alemtuzumab), RITUXAN[®] (Rituximab), TNKase (Tenecteplasa), MYLOTARG (gemtuzumab ozogamicina), NATRECOR (nesiritida), ARANESP (darbepoyetina alfa), NEULASTA (pegfilgrastim), NEUMEGA (oprelvekina), NEUPOGEN (Filgrastim), NORDITROPIN CARTRIDGES (Somatropina), NOVOSEVEN (Eptacog alfa), NUTROPIN AQ (somatropina), Oncaspar (pegaspargasa), ONTAK (denileukina diffitox), ORTHOCLONE OKT (muromonab-CD3), OVIDREL (coriogonadotropina alfa), PEGASYS (peginterferón alfa-2a), PROLEUKIN (Aldesleukina), PULMOZYME (dornasa alfa), Retavase (Reteplesa), REBETRON terapia de combinación que contiene REBETOL[®] (Ribavirina) e INTRON[®] A (Interferón alfa-2b), REBIF (interferón beta-1 a), REFACTO (factor antihemofílico), REFLUDAN (lepirudina), REMICADE (infliximab), REOPRO (abciximab), ROFERON[®]-A (Interferón alfa2a), SIMULECT (baasiliximab), SOMAVERT (Pegivisomant), SYNAGIS[®] (palivizumab), Stemben (Ancestim, factor de células madre), THYROGEN, INTRON[®] A (Interferón alfa-2b), PEG-INTRON[®] (Peginterferón alfa-2b), XIGRIS[®] (Drotrecogina alfa activada), XOLAIR[®] (Omalizumab), ZENAPAX[®] (daclizumab), ZEVALIN[®] (Ibritumomab Tiuxetan).

4. Variación de secuencias

60 Proteínas particularmente preferidas respecto a todos los anteriores y los siguientes incluyen las que comprenden una región que tiene una identidad del 70 % o más, especialmente del 80 % o más, más especialmente 90 % o más, todavía más especialmente del 95 % o más, particularmente del 97 % o más, más particularmente del 98 % o más, todavía más particularmente del 99 % o más de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia de una proteína de unión, como se ha ilustrado anteriormente, en particular una proteína de unión farmacéutica, tal como GenBank y otra secuencia de referencia de una proteína de referencia.

65 La identidad a este respecto se puede determinar usando diversos software de análisis de la secuencia de aminoácidos bien conocidos y fácilmente disponibles. Software preferidos incluye los que implementan los

algoritmos de Smith-Waterman, considerados una solución satisfactoria del problema de búsqueda y alineación de secuencias. También se pueden usar otros algoritmos, en particular cuando la velocidad es una consideración importante. Programas habitualmente usados para apareamiento por alineación y homología de ADN, ARN y polipéptidos que se pueden usar a este respecto incluyen FASTA, TFASTA, BLASTN, BLASTP, BLASTX, TBLASTN, PROSRCH, BLAZE y MPSRCH, siendo el último una implementación del algoritmo de Smith-Waterman para ejecución en procesadores masivamente paralelos de MasPar.

Los programas BLASTN, BLASTX, y BLASTP están entre los programas preferidos para dichas determinaciones, el primero para comparaciones de secuencias de polinucleótidos y los dos últimos para comparación de secuencias polipeptídicas. BLASTX para comparación de las secuencias polipeptídicas de los tres marcos de lectura de la secuencia polinucleotídica y BLASTP para una única secuencia polipeptídica.

BLAST proporciona diversos parámetros definibles por el usuario que se fijan antes de implementar una comparación. Algunos de ellos son más fácilmente evidentes que otros sobre interfaces de usuario gráficas, tales como los proporcionados por NCBI BLAST y otros programas de alineación de la secuencia que se pueden acceder por internet. Los parámetros y sus valores se fijan y explican en los sitios web de servicios y se explican y fijan con detalle en diversos textos fácilmente disponibles, incluidos, entre otros, Bioinformatics: Sequence And Genome Analysis, 2ª Ed., David W. Mount, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2004), especialmente los Capítulos 3, 4, 5, y 6 en lo que respecta a la comparación de secuencias proteicas y de ácidos nucleicos en general y el lo que respecta a las búsquedas y comparaciones BLAST en particular; Sequence Analysis In A Nutshell: A Guide To Common Tools And Databases, Scott Markel and Darryl Leon, O'Reilly & Associates, Sebastopol, California (2003), especialmente el Capítulo 7 en lo que respecta a BLAST en concreto, particularmente en las partes pertinentes a la comparación de secuencias nucleotídicas y polipeptídicas y para determinar su grado de identidad, similitud, homología y/o similar, especialmente en lo que respecta a la comparación de una secuencia de ensayo y una secuencia de referencia para calcular un grado (porcentaje) de identidad entre ellos.

En realizaciones preferidas de la invención a este respecto, la relación de las secuencias se define como la puntuación de la identidad en porcentaje retornado por una cualquiera u otra de las búsquedas de comparación BLAST mencionadas anteriormente con $e = 10$ y todos los demás parámetros fijados en sus valores por defecto en el servidor web de NCBI como se indica en Sequence Analysis In A Nutshell: A Guide To Common Tools And Databases, Scott Markel and Darryl Leon, O'Reilly & Associates, Sebastopol, California (2003), páginas 47-51 en todas las características de los valores preferidos para los parámetros de la presente invención para comparar secuencias usando BLAST, como las de NCBI BLAST.

Loas siguientes referencias proporcionan información adicional sobre las comparaciones de secuencia a este respecto y en otros. Guide To Human Genome Computing, Ed. Martin J. Bishop, Academic Press, Harcourt Brace & Company Publishers, New York (1994), particularmente en las partes pertinentes a la determinación de la identidad y/u homología de las secuencias de aminoácidos o polinucleótidos, especialmente el Capítulo 7. Los programas BLAST se describen en Altschul y col., "Basic Local Alignment Research Tool," J Mol Bioi 215: 403-410 (1990). Se proporciona información adicional concerniente al análisis de la secuencia y las determinaciones de la homología y la identidad en, entre muchas otras referencias bien conocidas y fácilmente disponibles para los expertos en la técnica: Nucleic Acid And Protein Sequence Analysis: A Practical Approach, Eds. M. J. Bishop and C. J. Rawings, IRL Press, Oxford, UK (1987); Protein Structure: A Practical Approach, Ed. T. E. Creighton, IRL Press, Oxford, UK (1989); Doolittle, R. F., "Searching through sequence databases," Met Enz. 183: 99-110 (1990); Meyers and Miller, "Optimal alignments in linear space" Comput. Applica. in Biosci 4: 11-17 (1988); Needleman and Wunsch, "A general method applicable to the search for similarities in amino acid sequence oftwo proteins," J Mol Bio148: 443-453 (1970) y Smith and Waterman, "Identification of common molecular subsequences," J Mol Bioi 147: 1950 et seq. (1981), particularmente en las partes pertinentes a la comparación de secuencias y a las determinaciones de la identidad y la homología.

Realizaciones particularmente preferidas a este respecto tienen del 50 % al 150 % de la actividad de la proteína de referencia mencionada anteriormente, realizaciones particularmente muy preferidas a este respecto tienen del 60 % al 125 % de la actividad de la proteína de referencia, otras realizaciones particularmente muy preferidas más tienen del 75 % al 110 % de la actividad de la proteína de referencia, realizaciones todavía más preferidas tienen del 85 % al 125 % de la actividad de la proteína de referencia, realizaciones todavía más altamente preferidas tienen del 90 % al 110 % de la actividad de la proteína de referencia.

H. Tampones y Diluyentes

Los tampones de acuerdo con este aspecto de la invención son compatibles con la proteína adecuada para el usuario final deseado, proporcionan una capacidad tampón adecuada a concentraciones consistentes con una osmolaridad aceptable, son inertes, estables y tienen la capacidad tampón máxima en o cerca del pH deseado.

Se pueden usar varios tampones en la solución de liofilización de acuerdo con varios aspectos y realizaciones preferidas de la invención a este respecto. (se pueden usar algunos de los mismos tampones para reconstituir liofilizados, como se trata más adelante). Los tampones preferidos en este aspecto de la invención incluyen histidina,

5 glutamato, Tris y succinato, por mencionar solo unos pocos. Particularmente preferidos para algunas proteínas son los sistemas tampón de histidina, por ejemplo Fc-IL-1 ra. Para otras proteínas, Tris es altamente preferido, por ejemplo etanercept. Preferentemente, la concentración del tampón está en el intervalo de 5 a 100 mM. Particularmente preferentemente está en el intervalo de 10 a 50 mM. En ciertas realizaciones preferidas, la concentración del tampón preferida es de 10 a 20 mM.

10 Los tampones de acuerdo con este aspecto de la invención son eficaces para mantener un pH adecuado. El pH óptimo exacto variará de una proteína a otra. De acuerdo con esto, diferentes sistemas tampón serán más o menos mejores que otro para proteínas diferentes. No obstante, en general, los tampones preferidos son eficaces para el pH en el intervalo de 5 a 8, especialmente en el intervalo de 5,5, a 7,5.

I. Agentes espesantes

15 Se pueden usar varios agentes espesantes de acuerdo con varios aspectos y realizaciones preferidas de la invención divulgada en el presente documento. En concreto, los agentes espesantes se pueden usar a este respecto para facilitar la formación e tortas de liofilizado uniformes con la estructura y la porosidad deseados.

20 Entre los agentes espesantes útiles a este respecto se encuentran manitol, lactosa anhidra, sacarosa, D(+)-trehalosa, dextrano 40, povidona (PVP K24), glicina e hidroxietilalmidón. Entre los agentes espesantes particularmente preferidos a este respecto son manitol, trehalosa y glicina. Especialmente particularmente preferidos a este respecto son manitol, glicina e hidroxietilalmidón.

J. Lioprotectores

25 Los lioprotectores son sustancias que, en general, protegen a las proteínas contra la desnaturalización como resultado de la liofilización. En ciertos aspectos y realizaciones preferidas de la invención, los lioprotectores se usan en el proceso de liofilización y los liofilizados y composiciones resultantes producidos de este modo comprenden los mismos. Entre los lioprotectores de acuerdo con ciertas realizaciones preferidas de la invención son sacarosa, trehalosa y manitol.

30

K. Agentes antiespumantes/Tensioactivos

35 También se pueden usar agentes antiespumantes y tensioactivos de acuerdo con varios aspectos y realizaciones preferidas de la invención. Entre los agentes antiespumantes preferidos se encuentran los tensioactivos no iónicos, concentraciones bajas de disolventes orgánicos (menos del 10 % p/v), agentes anti-gas, tales como simeticona, y agentes de salación, tales como CaCl_2 y MgCl_2 .

40 Tensioactivos no iónicos preferidos incluyen los tensioactivos polisorbato y Pluronic. Tensioactivos polisorbato y Pluronic especialmente particularmente preferidos son polisorbato 20, polisorbato 80 y Pluronic F68. Entre los polisorbatos comercialmente preferidos a menudo se prefieren Tween 20 y Tween 80.

45 En ciertas de las realizaciones preferidas a este respecto, el polisorbato 80 es particularmente preferido, solo o con otros agentes antiespumantes y/o tensioactivos, particularmente a una concentración de 0,0005 % a 2 % en peso/v. Muy particularmente preferida es una concentración de 0,001 % a 0,5 % en peso/v. Además a este respecto, la concentración de polisorbato 80 de 0,002 % a 0,1 % en peso/v es muy particularmente preferida, y una concentración de polisorbato 80 de 0,002 % a 0,05 % en peso/v es muy particularmente preferida. El polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0,004 % en peso/v es muy altamente especialmente preferida. Entre los tensioactivos polisorbatos comercialmente disponibles, a menudo se prefiere Tween 80.

50 En ciertas realizaciones preferidas adicionales a este respecto, el Pluronic F68 es particularmente preferido, solo o con otros agentes antiespumantes y/o tensioactivos, particularmente a una concentración de 0,2 % a 2 % en peso/v. Concentraciones muy particularmente preferidas de Pluronic F68 son de 0,5 % a 1,5 %. Además a este respecto, una concentración de 0,8 % a 1,2 % es altamente particularmente preferida y una concentración de 1,0 % es muy altamente particularmente preferida.

55

60 En ciertas de las realizaciones preferidas adicionales a este respecto, se prefiere el polisorbato 20o, solo o con otros agentes antiespumantes y/o tensioactivos, particularmente a una concentración de 0,0005 % a 2 % en peso/v. Muy particularmente preferida es una concentración de 0,001 % a 0,5 % en peso/volumen. Además a este respecto, una concentración de polisorbato 20 de 0,002 % a 0,1 % en peso/v es altamente particularmente preferida y una concentración de polisorbato 20 de 0,002 % a 0,05 % es muy altamente particularmente preferida. El polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0,004 % en peso/v es muy altamente especialmente preferida. Entre los tensioactivos polisorbato 20 comercialmente disponibles, a menudo se prefiere Tween 20.

II. Procedimientos de liofilización

65 Se describen procedimientos que proporcionan composiciones como se ha descrito anteriormente. Varias realizaciones de aspectos de la invención a este respecto proporcionan procedimientos de liofilización en los que: (a)

se mantiene una presión de vacío durante la congelación que garantiza la formación de un liofilizado con el área de superficie y/o porosidad deseada; y/o (b) las concentraciones de la proteína y el(los) agentes espesantes (si hay alguno) durante la congelación se seleccionan para garantizar la formación de un liofilizado con el área de superficie y/o porosidad deseada; y/o (c) las temperaturas seleccionadas para hibridar y la desecación secundaria garantiza la formación deseada de polimorfos durante la liofilización y/o la distribución de los polimorfos en la composición liofilizada.

En realizaciones concretas, la composición que se va a liofilizar comprende manitol y las condiciones de liofilización, incluidas una cualquiera o más de (a), (b), y (c) en el párrafo anterior, garantiza que el manitol en el liofilizado está formado por igual o más de aproximadamente 70 % de delta manitol, igual o menos que aproximadamente 20 % de manitol hidrato e igual o menor que aproximadamente 10 % de manitol amorfo. En realizaciones concretas a este respecto, la composición y las condiciones de liofilización garantizan que el manitol en el liofilizado esté formado por igual o más de aproximadamente 70 % de delta manitol, igual o menos que aproximadamente 20 % de manitol hidrato e igual o menos que aproximadamente 10 % de manitol amorfo.

En varias realizaciones, la composición que se va a liofilizar y las condiciones de liofilización, incluidas una cualquiera o más de (a), (b) o (c) en el párrafo anterior, garantiza que el área de superficie del liofilizado es mayor o igual a 1,2 m²/g e igual o menor que 1,7 mm²/g. En realizaciones concretas a este respecto, la composición y las condiciones garantizan que el área de superficie del liofilizado es mayor o igual a 1,2 m²/g e igual o menor que 1,7 mm²/g.

En ciertas realizaciones de la invención, además de cualquiera de las anteriores, las soluciones se desgasifican antes de la liofilización y/o el diluyente se desgasifica antes de la adición a la composición liofilizada. En varias realizaciones de la invención, el diluyente usado para reconstituir la composición liofilizada comprende un tensioactivo. En realizaciones concretas a este respecto, el tensioactivo es uno de polisorbato 20 y Pluronic F68 o ambos.

En realizaciones de la invención, además de cualquiera de los anteriores, la solución para liofilización y las condiciones de liofilización garantizan la formación de composiciones liofilizadas en las que en tres minutos o menos tras la adición de un diluyente a dicho liofilizado. (a) el liofilizado está al menos un 90 % +/-10 % disuelto; (b) la altura de la espuma por encima de la solución resultante es inferior al 35 % de la altura de la espuma por encima de la solución más la altura de la solución; (c) no hay ninguna efervescencia visible en la solución; y (d) la concentración de dicha proteína en dicho diluyente tras la reconstitución es de al menos 40 mg/ml.

En ciertas realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, la formulación de la composición para liofilización y las condiciones para liofilización proporcionan composiciones liofilizadas en las que en tres minutos tras la adición del diluyente:

(a) el liofilizado está al menos un 90 % +/-10 % disuelto; (b) la altura de la espuma por encima de la solución resultante es inferior al 25 % de la altura de la espuma más la altura de la solución; y (c) no hay efervescencia visible en la solución y/o no hay burbujas visibles en la solución.

En varias realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, la composición para liofilización y las condiciones para liofilización garantizan la formación de un liofilizado, en las que en tres minutos tras la adición del diluyente: (a) el liofilizado está al menos un 90 % +/-10 % disuelto; (b) la altura de la espuma por encima de la solución resultante es inferior al 15 % de la altura de la espuma más la altura de la solución; y (c) no hay efervescencia visible en la solución.

En algunas realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, la composición para liofilización y las condiciones para liofilización garantizan la formación de un liofilizado, en las que en tres minutos tras la adición del diluyente: (a) el liofilizado está al menos un 90 % +/-10 % disuelto; (b) la altura de la espuma por encima de la solución resultante es inferior al 5 % de la altura de la espuma más la altura de la solución; y (c) no hay efervescencia visible en la solución.

En diversas realizaciones, en lugar de o además de cualquiera de los anteriores, la composición para liofilización y las condiciones para liofilización garantizan la formación de un liofilizado, en las que en cualquiera de 10, 5, 3, 2 o 1 minuto tras la adición del diluyente: (a) el liofilizado es cualquiera de al menos: 75, 85, 90, 93, 95, 97, 98 o 99 % disuelto; (b) el liofilizado está al menos un 99 % +/-10 % disuelto; (b) la altura de la espuma por encima de la solución resultante es inferior al 5 % de la altura de la espuma más la altura de la solución; y (c) no hay efervescencia visible en la solución.

En varias realizaciones, además de cualquiera de lo anterior, la composición para liofilización y las condiciones para liofilización garantizan la formación de un liofilizado que tiene un área de superficie igual o mayor que cualquiera de 1,2, 1,3 o 1,4 m²/g. En realizaciones concretas a este respecto, el liofilizado tiene un área de superficie que es igual o mayor que cualquiera de 1,2, 1,3 o 1,4 m²/g; en ciertas realizaciones concretas más de 1,2 m²/g. En varias realizaciones, el liofilizado tiene un área de superficie que es igual o mayor que cualquiera de 1,2, 1,3 o 1,4 m²/g e igual o menor que cualquiera de aproximadamente 1,5, 1,7, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, o 5,0 m²/g, en realizaciones concretas

que tienen cualquier combinación de los límites inferiores y superiores anteriores. En ciertas realizaciones a este respecto, el liofilizado tiene un área de superficie que es igual o mayor que cualquiera de 1,2, 1,3 o 1,4 m²/g e igual o menor que cualquiera de 1,5, 1,7, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, o 5,0 m²/g, en realizaciones concretas que tienen cualquier combinación de los límites inferiores y superiores anteriores. En varias realizaciones, el liofilizado tiene un área de superficie que es igual o mayor que 1,2 m²/g. En varias realizaciones, el liofilizado tiene un área de superficie que es igual o mayor que 1,2 m²/g.

En muchas realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, la composición para liofilización y las condiciones de liofilización garantizan la formación de un liofilizado, en la que la adición de diluyente tiene como resultado una solución con una concentración de proteínas de aproximadamente 40 a 250 mg/ml. En varias realizaciones es de aproximadamente 40 a 200 mg/ml. En ciertas realizaciones es de aproximadamente 75 a 150 mg/ml. En realizaciones concretas es de aproximadamente 50 a 100 mg/ml. En numerosas realizaciones es de al menos aproximadamente 35 mg/ml. En varias realizaciones es de al menos aproximadamente 40 mg/ml.

En muchas realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, la composición para liofilización y las condiciones de liofilización garantizan la formación de un liofilizado, en la que la adición de diluyente tiene como resultado una solución con una concentración de proteínas de cualquiera de 40 a 250, de 35 a 225, de 40 a 200, de 75 a 150 o de 50 a 100 mg/ml. En numerosas realizaciones, la concentración es cualquiera de al menos 35, 40, 45, 50, 60, 75, 90, 100, 125 o 150 mg/ml. En numerosas realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, la composición para liofilización y las condiciones de liofilización garantizan la formación de un liofilizado, en el que en un plazo de cualquiera de 10, 5, 3, 2 o 1 minuto de la adición del diluyente al liofilizado no hay turbidez visible en la solución y/o no hay burbujas visibles en la solución y/o no hay partículas visibles en la solución y/o la solución fluye fácilmente.

En numerosas realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, la composición para liofilización y las condiciones de liofilización garantizan la formación de un liofilizado, en la que la solución resultante tiene una viscosidad lo suficientemente baja como para fluir con eficiencia a través de una aguja hipodérmica de un calibre eficaz para inyección subcutánea en sujetos humanos. En varias realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, la composición para liofilización y las condiciones de liofilización garantizan la formación de un liofilizado, en el que la composición comprende una cualquiera o más de al menos un agente espesante y/o al menos un agente estabilizante y/o al menos un tensioactivo.

En ciertas realizaciones, además de uno cualquiera de los anteriores, el agente estabilizante es sacarosa.

En varias realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, el tensioactivo es polisorbato. En realizaciones concretas a este respecto, la concentración del polisorbato es de 0,004 % a 0,15 %. En numerosas realizaciones a este respecto, el tensioactivo es un polisorbato 80 o un polisorbato 20 en una concentración de 0,004 % a 0,15 %. En ciertas realizaciones además de cualquiera de los anteriores, el tensioactivo es Pluronic F68. En realizaciones concretas a este respecto, el tensioactivo es Pluronic F68 en una concentración de 0,05 % a 1,5 %.

En muchas realizaciones, además de cualquiera de los anteriores, la proteína es un agente para uso terapéutico humano o para uso veterinario. En realizaciones concretas, adicionalmente la proteína es un agente farmacéutico para uso terapéutico humano.

La Figura 1 proporciona una representación esquemática de las etapas de un procedimiento de liofilización preferido de acuerdo con la invención. Debe apreciarse que la Figura 1 se proporciona a modo de ilustración solo y no representa ninguna limitación concreta de la invención. En concreto, las temperaturas, tiempos, pendientes y el número de etapas sus naturalezas variarán de aquéllas en la Figura 1 de acuerdo con otros aspectos y realizaciones de la invención, como se trata más adelante.

A. Preparación de la muestra

Las proteínas se pueden preparar para liofilización de acuerdo con la invención usando técnicas estándar. Por tanto, por ejemplo, las proteínas se pueden formular en solución con los agentes tampón, agentes espesantes, lioprotectores, tensioactivos deseados y otros componentes deseados mediante diálisis, di filtración, precipitación y resuspensión y/o dilución, entre otros procedimientos que son bien conocidos y usados de forma convencional a este respecto. En general, los procedimientos de preparación usados y los componentes de la formulación de la muestra para el procedimiento de liofilización no afectarán de forma perjudicial a la proteína, serán estables, proporcionarán una formulación tras una reconstitución adecuada para el uso indicado del liofilizado y, por tanto, ambos serán compatibles y aceptables.

En realizaciones preferidas de la invención a este respecto, la formulación de la muestra se desgasifica antes de la liofilización. La desgasificación de la formulación se puede conseguir por medios convencionales bien conocidos. Un procedimiento preferido para desgasificar es la desgasificación al vacío. Cualquiera que sea el procedimiento usado deberá ser compatible con la muestra y el uso final para usos terapéuticos veterinarios y humanos. La desgasificación se deberá llevar a cabo en condiciones de esterilidad adecuadas.

Opcionalmente, en ciertas realizaciones preferidas de la invención, antes de congelar, las formulaciones de la muestra se enfrían hasta una temperatura de retención inicial y se mantienen a la temperatura durante un periodo de retención antes de reducirse más la temperatura y se congela como se ha descrito en la etapa siguiente. Temperaturas preferidas a este respecto son de 3° C a 7° C. Particularmente preferidas son las temperaturas de 4° C to 6° C, y la temperatura altamente particularmente preferida es de aproximadamente 5 °C.

B. Congelación

De acuerdo con ciertos aspectos y realizaciones preferidas de la invención, una composición que comprende una proteína de interés formulada de acuerdo con la etapa anterior se congela en condiciones cuidadosamente controladas. Sin estar limitado a ningún mecanismo concreto, actualmente se cree que las condiciones de congelación óptimas programan nucleación en hielo y formación de poros en el material congelado que permiten la sublimación eficiente del agua congelada en la muestra congelada (normalmente durante las posteriores etapas de desecación, como se ha descrito más adelante). En ciertas de las realizaciones preferidas a este respecto, la congelación se lleva a cabo a vacío parcial. En ciertas otras realizaciones preferidas a este respecto, la composición que comprende proteínas se enfría lentamente. En todavía otras más realizaciones preferidas a este respecto, la composición se enfría hasta que está muy completamente congelada y, en ciertas realizaciones particularmente preferidas a este respecto, se superenfria.

Las velocidades de enfriamiento óptimas para congelar de acuerdo con este aspecto de la invención variarán con la naturaleza exacta de la composición que comprende proteínas. En general, las condiciones para enfriar y congelar a este respecto se escogen de un modo tal que el hielo formado en el material congelado y la estructura del propio material facilita una sublimación eficiente y completa de agua sin efectos perjudiciales sobre la proteína congelada o su reconstitución. Puede ser necesaria alguna experimentación para determinar exactamente las condiciones óptimas para congelar una composición que contiene proteínas dada de modo que se puede reconstituir de forma fiable y rápida a una concentración deseada en un diluyente deseado. No obstante, para la gran mayoría de composiciones que comprenden proteínas, las condiciones entrarán dentro de las condiciones preferidas indicadas más adelante.

Las velocidades de congelación preferidas de la invención a este respecto están entre 0,001 °C y 5,0 °C por minuto. Las velocidades particularmente preferidas a este respecto están entre 0,005 °C y 2 °C por minuto. Las velocidades muy particularmente preferidas a este respecto están entre 0,01 °C y 1 °C por minuto. Las velocidades altamente particularmente preferidas a este respecto están entre 0,01 °C y 0,8 °C por minuto. Las velocidades especialmente preferidas a este respecto están entre 0,2 °C y 0,5 °C por minuto.

Entre las temperaturas de congelación preferidas que se alcanzan al final del ciclo de enfriamiento de acuerdo con la invención están las temperaturas en el intervalo de -5° C a -200° C. Particularmente preferidas son las temperaturas en el intervalo de -15° C a -150° C. Altamente particularmente preferidas son las temperaturas en el intervalo de -25° C a -100° C. Especialmente preferidas son las temperaturas en el intervalo de -35° C a -6° C. Muy especialmente preferidas son las temperaturas en el intervalo de -35° C a -60° C.

Para ciertos ejemplos ilustrativos proporcionados en el presente documento más adelante, por ejemplo, las composiciones que contiene proteínas de interés se enfrían de 20 °C a -50 °C a 0,3 °C por minuto y, después, se mantienen a -50 °C durante un tiempo.

C. Temperatura de retención baja

Una vez que la muestra se ha enfriado hasta la temperatura de congelación deseada, se retiene a dicha temperatura. Las temperaturas de congelación preferidas se mencionan en la sección anterior. Aunque el tiempo de retención difiera para diferentes muestras y probablemente los tiempos de retención óptimos a menudo diferirán para las mismas muestras, liofilizados en diferentes geometrías o usando máquinas diferentes, los tiempos de retención preferidos estarán, en general, de acuerdo con lo siguiente. Para retención de muestras a -50 °C, tiempos de retención preferidos a menudo estarán en el intervalo de 30 minutos a varias horas. Particularmente preferidos, para muestras y procedimientos similares a los de los ejemplos proporcionados más adelante, los tiempos de retención son de 30 minutos a 2 horas. Especialmente preferidos a este respecto son los tiempos de retención en el intervalo de 45 minutos a 90 minutos, especialmente tiempos de retención de aproximadamente 1 hora.

D. Calentamiento a la temperatura de hibridación

De acuerdo con varios aspectos y realizaciones adicionales de la invención descritos en el presente documento, tras congelar como se ha descrito anteriormente, las composiciones que comprenden proteínas de acuerdo con la invención se calientan e hibridan. Sin estar limitado a ningún mecanismo o explicación concretos de los procesos subyacentes, se cree que las condiciones de hibridación adecuadas pueden programar la cristalización de sustancialmente todos los excipientes en la composición, tales como los agentes espesantes. Por ejemplo, los parámetros de hibridación pueden garantizar que sustancialmente todos los cristales excipientes pequeños se condensan entre sí (se unen). Como alternativa, los parámetros de hibridación se pueden ajustar para garantizar

que los excipientes permanezcan en la fase amorfa, de modo que puedan ser deseables para sacarosa y trehalosa. La hibridación previene la cristalización en otros momentos cuando pueda afectar de forma perjudicial a la estructura de la composición, tal como a su porosidad, y afectar de forma adversa a la liofilización y las propiedades del liofilizado obtenido en última instancia. También previene el movimiento del cristal que podría tener efectos perjudiciales similares, en particular a las temperaturas más altas usadas en las etapas de desecación (se trata más adelante).

Puede ser necesaria una cierta cantidad de experimentación para determinar las condiciones óptimas para el calentamiento e hibridación para diferentes composiciones, como las que comprenden diferentes agentes espesantes y/u otros excipientes. No obstante, las condiciones óptimas para calentar e hibridar la gran mayoría de composiciones que comprenden proteínas entrarán dentro de los parámetros proporcionados más adelante.

Las velocidades de calentamiento críticas de la invención a este respecto están entre 0,001 °C y 5,0 °C por minuto. Las velocidades particularmente preferidas a este respecto están entre 0,01 °C y 2 °C por minuto. Las velocidades muy particularmente preferidas a este respecto están entre 0,1 °C y 1 °C por minuto. Las velocidades muy altamente particularmente preferidas a este respecto están entre 0,2 °C y 0,8 °C por minuto.

Entre las temperaturas de hibridación preferidas que se alcanzan al final de la rampa de calentamiento de acuerdo con la invención a este respecto están las temperaturas en el intervalo de -35° C a 0,0° C. Particularmente preferidas son las temperaturas en el intervalo de -30° C a -5,0° C. Altamente particularmente preferidas son las temperaturas en el intervalo de -25° C a -5,0° C. Especialmente preferidas son las temperaturas en el intervalo de -25° C a -10° C. Muy especialmente preferidas son las temperaturas en el intervalo de -20° C a -10° C.

E. Retención a la temperatura de hibridación

Una vez que la muestra alcanza la temperatura de hibridación, se mantiene a dicha temperatura durante un periodo de tiempo. Normalmente, una muestra se mantiene a la temperatura de hibridación durante un periodo de tiempo suficiente para sustancialmente todo(s) lo(s) excipiente(s) en la composición para hibridar, en general durante varias horas. Preferidos a este respecto son periodos de hibridación de 2 a 20 horas. Particularmente preferidos son los periodos de hibridación de 5 a 15 horas. Muy particularmente preferidos son los periodos de hibridación de 1 a 6 horas, especialmente de 1 a 6 horas, especialmente de 2 a 5 horas, muy especialmente de 3 a 4 horas.

Es crucial mantener la muestra por debajo de la T_v a lo largo del periodo de la retención a la temperatura de hibridación.

F. Reducción de la temperatura

Cuando el periodo anterior se ha completado, las composiciones de acuerdo con ciertos aspectos y realizaciones preferidos de la invención descritas en el presente documento se enfrían y su temperatura se reduce. Sin quedar limitado a ninguna explicación concreta o mecanismo subyacente a este respecto, se cree que disminuir la temperatura en este punto reduce el movimiento térmico en la composición a cerca de un mínimo y, en esencia, cierra las estructuras de la composición, en concreto las formadas durante la etapa previa.

Es particularmente importante de acuerdo con ciertos aspectos y realizaciones preferidas de la invención a este respecto para mantener la temperatura de la composición por debajo de la T_v durante la reducción de la temperatura y en las posteriores etapas del procedimiento.

Las velocidades de reducción de la temperatura preferidas a este respecto están entre 0,001 °C y 5,0 °C por minuto. Las velocidades particularmente preferidas a este respecto están entre 0,005 °C y 2 °C por minuto. Las velocidades muy particularmente preferidas a este respecto están entre 0,01 °C y 1 °C por minuto. Las velocidades muy altamente particularmente preferidas a este respecto están entre 0,01 °C y 0,8 °C por minuto. Las velocidades especialmente preferidas a este respecto están entre 0,2 °C y 0,5 °C por minuto.

Entre las temperaturas preferidas que se alcanzan al final de esta etapa de acuerdo con la invención están las temperaturas en el intervalo de -5° C a -200° C. Particularmente preferidas son las temperaturas en el intervalo de -15° C a -150° C. Altamente particularmente preferidas son las temperaturas en el intervalo de -25° C a -100° C. Especialmente preferidas son las temperaturas en el intervalo de -35° C a -65° C. Muy especialmente preferidas son las temperaturas en el intervalo de -35° C a -60° C.

G. Retención de la temperatura baja

Una vez que la muestra se ha enfriado hasta la temperatura deseada, se retiene a dicha temperatura. Las temperaturas preferidas se mencionan en la sección anterior. Aunque el tiempo de retención difiera para diferentes muestras y probablemente los tiempos de retención óptimos a menudo diferirán para las mismas muestras, liofilizados en diferentes geometrías o usando máquinas diferentes, los tiempos de retención preferidos estarán, en general, de acuerdo con lo siguiente. Tiempos de retención preferidos están en el intervalo de 25 minutos a 50

minutos. Particularmente preferidos son los tiempos de retención de 25 minutos a 35 minutos, especialmente tiempos de retención de aproximadamente 30 minutos.

5 Antes de iniciar la siguiente etapa que implica calentar la muestra y elevar su temperatura se deberá reducir la presión atmosférica de la muestra. Para muestras similares a las descritas en el presente documento e ilustradas en los ejemplos siguientes, las presiones preferidas están en el intervalo de 25 a 250 mTorr. Particularmente preferidas son las presiones en el intervalo de 50 a 200 mTorr. Muy particularmente preferidas son las presiones entre 75 y 175 mTorr.

10 H. Calentamiento hasta una primera temperatura de desecación

De acuerdo con ciertos aspectos y realizaciones preferidas de la invención descritas en el presente documento, tras la etapa previa, las composiciones se calientan hasta una primera temperatura de desecación. Las velocidades de calentamiento preferidas están en el intervalo de 0,05 °C a 2,5 °C por minuto. Particularmente preferidas son las velocidades en el intervalo de 0,1 °C a 2,0 °C. Especialmente particularmente preferidas son las velocidades en el intervalo de 0,25 °C a 1,24 °C y muy especialmente particularmente preferidos son las velocidades en el intervalo de 0,5 °C a 1,0 °C.

20 Es importante el hecho de que la temperatura se mantiene por debajo de la temperatura de transición vítrea de la composición a lo largo del proceso. Los expertos en las técnicas pertinentes apreciarán que la T_v de la composición depende del contenido en agua. Por ejemplo (solo para fines ilustrativos y sin limitaciones), en los ejemplos proporcionados más adelante, la composición al comienzo del calentamiento hasta la primera temperatura de desecación se congela a -50 °C, contiene aproximadamente 80 % de agua y tiene un T_v de -32 °C. Al final de la rampa de calentamiento y retención a la primera temperatura de calentamiento, como se describe en la subsección (I) inmediatamente siguiente, la composición se congela a 0 °C, contiene aproximadamente un 50 % de agua y tiene una T_v de aproximadamente 5 °C.

30 Las condiciones exactas usadas óptimamente para una composición dada pueden variar de las condiciones exactas proporcionadas en el presente documento y puede ser necesaria una cierta cantidad de experimentación en un caso dado para determinar las condiciones óptimas. No obstante, para la gran mayoría de composiciones que comprenden proteínas, las condiciones óptimas entrarán dentro o caso de las condiciones e intervalos proporcionados en el presente documento.

35 El vacío en esta etapa se deberá mantener a las presiones indicadas en la etapa previa. No obstante, opcionalmente, la presión se puede reducir adicionalmente durante esta etapa de modo que cuando se alcance la primera temperatura de desecación, el vacío es inferior a 200 mTorr, preferentemente inferior a 150 mTorr, particularmente preferentemente de aproximadamente 50 mTorr.

40 I. Primer periodo de desecación

De acuerdo con ciertos aspectos y realizaciones preferidas de la invención descritas, tras la rampa de calentamiento, la composición se seca al vacío. En particular, la composición se seca al vacío a una temperatura inferior a la T_v durante un tiempo suficiente para reducir el contenido en agua hasta un valor deseado.

45 Es particularmente importante mantener la temperatura por debajo de la T_v durante el proceso de desecación.

50 Sin estar limitado a ningún mecanismo concreto o explicación de procesos subyacentes, mantener la composición al vacío a la primera temperatura de calentamiento (y siempre por debajo de la T_v) facilita la sublimación del agua congelada de la composición sin que afecte perjudicialmente a la estructura o a las propiedades deseables de los componentes no volátiles de la composición que no se eliminan mediante el procedimiento.

55 Las condiciones exactas para el calentamiento primario de una composición dada pueden diferir de las condiciones precisas divulgadas en los ejemplos siguientes. Puede ser necesaria una cierta cantidad de experimentación para determinar las condiciones óptimas para la etapa de calentamiento primaria para diferentes composiciones, como las que comprenden diferentes agentes espesantes y/u otros excipientes. No obstante, para la mayoría de las composiciones que comprenden proteínas, estas condiciones óptimas entrarán dentro de los parámetros proporcionados más adelante en el presente documento y, en su mayor parte, serán similares a las condiciones específicas indicadas en los ejemplos ilustrativos siguientes.

60 En realizaciones preferidas de la invención a este respecto, la primera temperatura de desecación es de al menos 1 °C, particularmente preferentemente al menos 2 °C, altamente preferentemente al menos 4 °C, especialmente al menos 5 °C o más, por debajo de la T_v inicial de la composición. En concreto, los intervalos preferidos para la primera temperatura de desecación son de 2 °C a 20 °C, particularmente preferible de 3 °C a 10 °C, preferentemente de 4 °C a 8 °C, por debajo de la T_v inicial de la composición a la primera temperatura de desecación.

65

En ciertas de otras realizaciones preferidas a este respecto, la composición se mantiene a la primera temperatura de desecación durante un periodo de tiempo extendido. En realizaciones particularmente preferidas a este respecto, la composición se mantiene a la primera temperatura de desecación durante de 5 a 50 horas y en realizaciones altamente preferidas se mantiene a la primera temperatura de desecación durante de 10 a 30 horas. En realizaciones especialmente preferidas a este respecto, la composición se mantiene a la primera temperatura de desecación durante de 10 a 20 horas.

Como se ha indicado anteriormente, la temperatura siempre se mantendrá al menos unos pocos grados por debajo de la T_v , que introduce un máximo práctico sobre la temperatura inicial para la primera etapa de desecación para cualquier compuesto dado. En realizaciones preferidas de la invención a este respecto, la temperatura de desecación es de 2 °C a 15 °C por debajo de la T_v , de 3 °C a 12 °C por debajo en realizaciones particularmente preferidas y de 4 °C a 8 °C por debajo en ciertas realizaciones especialmente preferidas. En ciertas realizaciones especialmente altamente preferidas es de 5 °C a 6 °C por debajo de la T_v .

Además, en ciertos aspectos y realizaciones preferidas de la invención a este respecto, la composición se mantiene al vacío o en o por debajo de 200 mTorr a la temperatura de desecación hasta que la cantidad de agua se ha reducido a entre 5 % y 25 % en peso de la composición, preferentemente a entre 5 % y 20 %, particularmente preferentemente a entre 7 % y 15 %.

En los ejemplos ilustrativos proporcionados más adelante, la primera etapa de desecación se llevó a cabo a 0 °C durante aproximadamente 15 horas hasta que el contenido en agua de la composición se redujo hasta aproximadamente un 10 %.

J. Calentamiento hasta una segunda temperatura de desecación

Al final del primer periodo de desecación a la primera temperatura de desecación, de acuerdo con ciertos aspectos y realizaciones preferidas de la invención divulgadas en el presente documento, la composición se calienta hasta una segunda etapa de desecación. La temperatura de la composición se mantiene por debajo de la T_v a lo largo de la rampa de temperatura hasta la segunda temperatura de desecación.

Las velocidades de calentamiento preferidas están en el intervalo de 0,05 °C a 2,5 °C por minuto. Particularmente preferidas son las velocidades en el intervalo de 0,1 °C a 2,0 °C. Especialmente particularmente preferidas son las velocidades en el intervalo de 0,25 °C a 1,24 °C y muy especialmente particularmente preferidos son las velocidades en el intervalo de 0,5 °C a 1,0 °C.

Temperaturas preferidas para la segunda etapa de desecación son de 15 °C a 35 °C. Temperaturas particularmente preferidas están en el intervalo de 20 °C a 30 °C. Especialmente particularmente preferida es una temperatura de aproximadamente 25° C ($\pm 2^\circ$ C).

El vacío se mantiene a lo largo de esta etapa. Se puede mantener a la misma presión que en la etapa anterior o se puede reducir más. Cuando las presiones de la primera y la segunda etapa de desecación difieren, más adelante se proporcionan las presiones de vacío preferidas para la segunda etapa de desecación.

K. Segundo periodo de desecación

De acuerdo con ciertos aspectos y realizaciones preferidas de la invención divulgada en el presente documento, la composición se mantiene al vacío a una segunda temperatura de desecación durante un tiempo suficiente al menos para reducir el agua residual a menos de 1 % e peso de la composición y, en realizaciones particularmente preferidas de la invención a este respecto, para reducir el agua residual a 0,5 % o menos.

Por supuesto, el segundo periodo de desecación dependerá de la temperatura. Cabe esperar que será más corto en general para temperaturas más altas, siendo todo lo demás relativamente igual. Los siguientes tiempos de desecación preferidos se refieren a la desecación a aproximadamente 25 °C. Los tiempos preferidos a este respecto son de 4 a 14 horas, particularmente preferidos de 6 a 12 horas, especialmente particularmente preferidos de 8 a 10 horas, y muy especialmente particularmente preferido aproximadamente 9 horas.

La presión al vacío en el segundo periodo de desecación puede ser igual o diferente de la del primer periodo de desecación. Preferentemente, la presión es inferior a 150 mTorr, particularmente preferentemente por debajo de 100 mTorr, especialmente particularmente preferentemente a 50 mTorr o menor.

L. Los liofilizados

Al final del periodo de desecación se obtiene un liofilizado al vacío con un contenido en humedad deseablemente bajo, una estructura de torta y otras propiedades que proporcionan estabilidad y facilidad de reconstitución como se describe en otros lugares del presente documento. Los liofilizados preferidos de la invención se pueden reformular mediante la adición de diluyente adecuado para formar soluciones proteicas concentradas en las que la

concentración proteica es como se describe con mayor detalle en otros lugares del presente documento. Además, los liofilizados se disuelven rápidamente, preferentemente en 10 minutos o menos, particularmente preferentemente en 5 minutos o menos, especialmente preferentemente en 3 minutos o menos. También se produce solvatación en el diluyente sin formación de un exceso de espuma, efervescencia o formación de partículas. Se forman pocas burbujas, si se forma alguna, y no interfieren en la dosificación adecuada. Las soluciones resultantes exhiben una turbidez mínima o son completamente transparentes, también como se describe con más detalle en otros lugares del presente documento. Por último, cuando se reconstituyen, los liofilizados de la invención proporcionan formulaciones adecuadas para el uso indicado.

10 M. Reconstitución

Como se ha descrito anteriormente, la invención proporciona una composición con propiedades de reconstitución mejoradas. Se pueden usar procedimientos generalmente conocidos y usados para reconstituir liofilizados convencionales con objeto de reconstituir los liofilizados de acuerdo con la presente invención. Evidentemente, los parámetros de liofilización se deben diseñar para dar lugar a un liofilizado que puede reconstituirse fácil y convenientemente para proporcionar la formulación adecuada a la aplicación dada.

En la presente invención, en realizaciones preferidas, la reconstitución del liofilizado proporciona una solución proteica altamente concentrada, como se describe en otros lugares del presente documento. En realizaciones particularmente preferidas, la formulación resultante es adecuada para inyección subcutánea. En realizaciones preferidas en la invención a este respecto, el diluyente usado para reconstituir el liofilizado se desgasifica antes de usar. La desgasificación se puede conseguir mediante procedimientos estándar, normalmente mediante vacío. Normalmente, un liofilizado se reconstituye en agua de la calidad y esterilidad adecuadas para el uso indicado para muchas aplicaciones. Preferentemente, el agua carece de burbujas.

Por otro lado, los liofilizados de acuerdo con la presente invención se reconstituyen usando procedimientos convencionales muy conocidos.

30 N. Formulaciones resultantes

Los liofilizados preferidos, de acuerdo con ciertas realizaciones preferidas de la invención, proporcionan formulaciones de proteínas altamente concentradas adecuadas para, en concreto, uso terapéutico humano y uso en otros organismos. En realizaciones particularmente preferidas a este respecto, los liofilizados de acuerdo con la invención se pueden reconstituir de un modo fiable y conveniente para proporcionar formulaciones adecuadas para administración subcutánea, no solo por los profesionales sanitarios sino también por los pacientes, y no solo en centros de atención sanitaria sino también en los domicilios y en otros lugares.

De acuerdo con esto, los liofilizados de acuerdo con realizaciones de la invención preferidas a este respecto, como se ha indicado anteriormente, se disuelven rápidamente tras la adición de diluyente con un mínimo de espumación, efervescencia, burbujas, turbidez y formación de partículas. Los liofilizados preferidos son suficientemente estables y solubles para una dosificación fiable en autoadministración en el domicilio tras un almacenamiento prolongado.

De acuerdo con lo anterior, realizaciones particularmente preferidas se reconstituyen usando agua que cumpla las normas requeridas para uso médico. Tras la adición del diluyente, liofilizados particularmente preferidos a este respecto forman soluciones acuosas que contienen la proteína liofilizada a una concentración de al menos 35 mg/ml. Además de las otras realizaciones preferidas descritas en otros lugares del presente documento, en ciertas realizaciones preferidas de la invención a este respecto, la reconstitución proporciona una formulación con una concentración elevada de proteínas. En ciertas realizaciones particularmente preferidas, la concentración es muy alta. En otras realizaciones más preferidas, es extremadamente alta. Numéricamente a este respecto, las concentraciones preferidas son al menos 35 mg/ml. Las concentraciones particularmente preferidas están en el intervalo de 35 mg/ml a 400 mg/ml. Las concentraciones muy particularmente preferidas a este respecto están en el intervalo de 40 mg/ml a 350 mg/ml. En realizaciones muy particularmente preferidas, está en el intervalo de 45 mg/ml a 300 mg/ml. En realizaciones especialmente preferidas, es de 50 a 250 mg/ml.

Además, la osmolaridad y la viscosidad de las formulaciones resultantes son adecuadas para el uso indicado. En concreto, la viscosidad no deberá ser tan alta que interfiera en la homogeneidad de la formulación y/o la administración. En particular, la viscosidad deberá ser lo bastante baja para un mezclado rápido de los componentes. Adicionalmente, en realizaciones preferidas es lo bastante baja para una carga conveniente en jeringas para inyección subcutánea.

60 **Ejemplos**

Los ejemplos siguientes son ilustrativos de aspectos y realizaciones concretos de la invención y no limitan de ningún modo su alcance. Muchos otros aspectos y realizaciones de la invención serán inmediatamente claros para los expertos en la técnica a partir de los contenidos de la presente divulgación y únicamente se puede obtener una comprensión completa de la invención divulgada en el presente documento mediante un exhaustivo examen de la

presente divulgación en todos sus detalles como lo entenderá un experto en la técnica con conocimientos completos de las técnicas pertinentes.

Ejemplo 1: Preparación de partida/Etanercept

5 Como material de partida se usó etanercept liofilizado ((25 mg/ml) en TMS (Tris 10 mM, 1 % de sacarosa, 4 % de manitol y un pH de 7,4). La proteína se concentró usando 15 ml de dispositivos de filtración Centriprep (PM de corte 10.000) a 50 mg/ml en TMS. El material de partida y el material concentrado se caracterizaron estructuralmente y se compararon. No se observó ningún daño inducido por la liofilización. Este material se usó en los ejemplos proporcionados más adelante.

Ejemplo 2: Etanercept/Espectroscopia UV

15 La concentración de proteína se determinó mediante absorbancia UV usando un coeficiente de extinción a 280 nm de 1,14 para una solución de 1 mg/ml. El diluyente se usó como blanco. Las muestras de placebo se escanearon de 240 nm a 400 nm usando un blanco de agua para confirmar la ausencia de proteína en el diluyente. La absorbancia máxima y la longitud de onda exacta de los picos también se registraron.

Ejemplo 3: Etanercept/Ciclos de liofilización

20 Etanercept a 25 mg/ml o 50 mg/ml en TMS se liofilizó en un liofilizador Genesis 12 EL (Virtis, Gardiner, NY), usando cuatro ciclos diferentes indicados en la Tabla 1.

25 Para cada uno de los ciclos, los viales de etanercept se llenaron con 1 ml de solución en una campana de bioseguridad. Se insertaron termopares de cobre-constantán en viales seleccionados a través de los orificios en los laterales de tapones especializados. La distancia entre el termopar y el fondo del vial se ajustó para que fuera de aproximadamente 1 a 3 mm. Los viales con el producto se rodearon de al menos dos filas de viales con TMS de placebo. Para conseguir un contacto más uniforme entre los viales y el estante se usaron bandejas de acero inoxidable con fondos extraídos.

30 Excepto lo indicado en la Tabla 1, para todos los ciclos los estantes se enfriaron previamente hasta 5 °C y el producto se equilibró a esta temperatura para alcanzar una temperatura uniforme antes de la cristalización en hielo. Después, el estante se enfrió hasta -50 °C seguido de hibridación a diferentes temperaturas. La formulación se enfrió después de nuevo hasta -50°C. A esto le siguió una desecación primaria a 0 °C a presión controlada y una desecación secundaria a 25 °C (en la mayoría de los casos).

35 Tras la finalización del ciclo, los viales se taparon simultáneamente en una cámara de presión de 200 mTorr.

TABLA 1: Etanercept/Ciclos de liofilización

Figura 1 de Referencia	Etapas	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4
A	Concentración inicial de proteínas de Etanercept	25 mg/ml	50 mg/ml	50 mg/ml	50 mg/ml
A	Temperatura de carga	20° C	20° C	20° C	20° C
A	Etapas de congelación 1	Ninguno	Subir hasta 5 °C y retener	Subir hasta 5 °C y retener	Subir hasta 5 °C y retener
B y C	Etapas de congelación 2	Subir 0,7 a -50 °C y retener durante 60 min	Subir 0,7 a -50 °C y retener durante 60 min	Subir 0,7 a -50 °C y retener durante 60 min	Subir 0,7 a -50 °C y retener durante 60 min
D y E	Etapas de hibridación 1	Subir 0,5 a -20 °C y retener durante 120 min	Subir 0,5 a -20 °C y retener durante 300 min	Subir 0,5 a -20 °C y retener durante 300 min	Subir 0,5 a -12 °C y retener durante 120 min
F y G	Etapas de hibridación 2	Subir 0,7 a -50 °C y retener durante 30 min	Subir 0,7 a -50 °C y retener durante 30 min	Subir 0,7 a -50 °C y retener durante 30 min	Subir 0,7 a -50 °C y retener durante 30 min
G	Evacuación de la cámara hasta el punto de presión fijado	150 mTorr	100 mTorr	100 mTorr	150 mTorr

Figura 1 de Referencia	Etapas	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4
H	Etapas de desecación primaria 1	(a) Subir 0,17 hasta -45° C, después (b) subir 0,22 hasta -25° C, después (c) subir 0,4 a 0° C	Subir 1 hasta 0°C a 50 mTorr	Subir 1 hasta 0 °C	Subir 1 hasta 0 °C
I	Etapas de desecación primaria 2	Retener a 0 °C durante 360 min a 38 mTorr	Retener a 0 °C durante 1080 min a 50 mTorr	Retener a 0 °C durante 1140 min a 50 mTorr	Retener a 0 °C durante 1080 min a 150 mTorr
J y K	Etapas de desecación secundaria	Subir 0,083 hasta 25 °C y retener durante 540 min	Subir 0,25 hasta 45 °C y retener durante 180 min	Subir 0,25 hasta 25 °C y retener durante 540 min	Subir 0,25 hasta 25 °C y retener durante 540 min
	Tiempo de desecación total	30,0 h	35,9 h	42,9 h	37,5 h

Ejemplo 4: Etanercept/Espectroscopia FTIR de segunda derivada

5 La estructura secundaria de la proteína en los liofilizados control y de la muestra se analizó usando espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier. En una caja de guantes purgada con nitrógeno seco, las muestras proteicas secas (aproximadamente 0,5 mg de proteínas) se mezclaron con 400 mg de KBr. La mezcla se molió y después se comprimió en un sedimento a 12,500 PSI. Este procedimiento no altera la estructura de las proteínas en el sólido seco. Los espectros se adquirieron con un espectrómetro de la serie Bomem MB y se procesaron. Los espectros de segunda derivada en la región amida 1 conformacionalmente sensible se normalizaron por área y se compararon.

Ejemplo 5: Etanercept/Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

15 Se llevó a cabo un análisis térmico usando un Pyris DSC (Perkin Elmer Corp.) equipado con enfriamiento con nitrógeno líquido. La calibración de la temperatura se realizó usando los puntos de fusión de n-dodecano, hexano e indio. Aproximadamente 15 µl de la solución se sellaron herméticamente en un recipiente de aluminio. Como referencia se usó un recipiente de aluminio vacío y una tapa. Los termogramas se registraron durante el ciclo de calentamiento a velocidades de calentamiento de 5 °C y 10 °C/min.

Ejemplo 6: EtanerceptiCromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

25 Los liofilizados se analizaron por cromatografía de exclusión por tamaño. La elución fue isocrática con una fase móvil de fosfato sódico 100 mM / NaCl 150 mM a pH 6,8. La columna sec. usada fue una Tosohaas TSK 3000SWx1 y el caudal fue de 0,6 ml/min. La absorbancia se midió a 215 y 280 nm. El tiempo de recorrido fue de 30 minutos. Antes de la inyección, las muestras de líquido congeladas se descongelaron y diluyeron en agua para inyectables (WFI) según la USP a 2,0 mg/ml. Las muestras liofilizadas se reconstituyeron y diluyeron con WDI a 2,0 mg/ml antes de la inyección. Las cantidades para inyección de la muestra fueron 20 microgramos. Las áreas del pico en el cromatograma se usaron para cuantificar las cantidades de monómero, especies de peso molecular alto (PMA) y especies de peso molecular bajo (PMB).

Ejemplo 7: Etanercept/Difracción de polvo en rayos X (XRPD)

35 Los patrones de difracción de polvo en rayos X de los polvos liofilizados se determinaron usando un difractor Phillips X-Pert. Se usaron una corriente de 40 mA y una tensión de 45 kV. La alineación del equipo se verificó antes de cada medición usando un pico de reflexión de silicio a 28,443°. Los polvos de diferentes formulaciones se rompieron suavemente y se montaron en un soporte de aluminio de fondo. Las muestras se escanearon de 2 ° a 40 ° a una velocidad de 2 °/min.

Ejemplo 8: Etanercept/Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Las tortas liofilizadas se rompieron en polvo y se recubrieron con oro mediante rociado. Después se analizó la morfología de la muestra a diferentes aumentos usando un microscopio electrónico de barrido Philips ESEM XL30.

Ejemplo 9: Etanercept/Propiedades de reconstitución

- (a) El tiempo para la reconstitución de las muestras liofilizadas en viales de DP se determinó mediante inspección visual.
- (b) La altura de la espuma observada al final de los 2 minutos tras la reconstitución se midió usando compases.

(c) La reconstitución se grabó en vídeo usando una cámara digital junto con observación visual.

Ejemplo 10: Etanercept/Humedad residual

5 La humedad residual en el material liofilizado se midió para cada lote de los viales control y DP de muestra. Se evaluó el contenido en humedad de los viales seleccionados durante el llenado mediante titulación colorimétrica. En un horno para muestras conectado a un vaso de reacción de Karl Fisher se introdujo un peso conocido de la muestra. La muestra se purgó con nitrógeno seco para eliminar toda humedad no unida. Después se calentó y se midió la humedad residual. Cada vial se sometió a la reacción de Karl Fisher en un vaso de reacción coulomat. Los resultados se calcularon como un porcentaje de humedad por vial. El valor final fue la media de todos los viales analizados. Los resultados se presentan en la tabla 3 siguiente.

Ejemplo 11: Etanercept/Parámetros fundamentales

15 La T_v , T_{cry} y la temperatura eutéctica de la formulación de etanercept a 50 mg/ml en Tris 10 mM, 1 % de sacarosa, 4 % de manitol, pH 7,4 se determinaron usando la instalación subambiente del DSC. La T_v del primer barrido fue $-27,1\text{ °C} \pm 2,9\text{ °C}$. La T_v del segundo barrido fue $-24,5\text{ °C} \pm 1,8\text{ °C}$. la temperatura de c cristalización fue $-8,5\text{ °C} \pm 1,0\text{ °C}$. La T_{eut} fue $-4,0\text{ °C}$.

Ejemplo 12: Etanercept/Efectos de las velocidades de congelación y el vacío sobre la estructura, la estabilidad y la reconstitución

25 Con el fin de entender el efecto de la velocidad de congelación sobre la estructura, la estabilidad y la reconstitución de etanercept a 50 mg/ml, las muestras se liofilizaron a dos velocidades de congelación diferentes en el liofilizador, es decir $0,3\text{ °C/min}$ y $0,7\text{ °C/min}$ o se congelaron sumergiendo en nitrógeno líquido durante 5 minutos antes de cargar en el liofilizador. Después, se dejó que las muestras sufrieran otras etapas de liofilización, ciclo 4 en la Tabla 1. Además de estas diferencias en las velocidades de congelación, también se analizó el efecto del vacío durante la congelación de las muestras sometiendo las muestras en los viales a una presión de 250 mTorr durante la etapa de congelación. Las muestras expuestas al vacío durante la congelación también se sometieron a un ciclo de congelación modificado, en el que las muestras se volvieron a congelar únicamente hasta -25 °C no hasta -50 °C , tras la etapa de hibridación. A continuación, las muestras se sometieron a una desecación primaria tras 1 hora a -25 °C . Tras la liofilización, las muestras se analizaron para determinar su estructura secundaria usando espectroscopia FTIR y sus propiedades de reconstitución.

35 En términos del aspecto de torta, las muestras sometidas a congelación usando nitrógeno líquido tenían un volumen de la torta menor en comparación con los volúmenes de la torta de los viales control, pero no parecieron colapsadas. Las muestras sometidas a un ciclo de congelación modificado, incluido vacío durante la congelación y volver a congelar hasta una temperatura superior a -25 °C reas la etapa de hibridación, tenían una capa de piel y el volumen de la torta era menor en comparación con el vial control. Los viales sometidos al enfriamiento con nitrógeno líquido y el ciclo de congelación modificado tenían un contenido en humedad mayor, obviamente a causa de la alterada estructura de poro que queda tras la sublimación del hielo y que conduce a una transferencia de masa ineficiente durante las etapas de desecación primaria y secundaria.

45 El análisis FTIR de la estructura de las muestras en el estado sólido muestra que la estructura secundaria de las muestras no se alteró significativamente en comparación con las muestras sometidas al ciclo de desarrollo modificado. Las bandas de lámina intermoleculares que aparecen a alrededor de 1615 cm^{-1} y 1695 cm^{-1} se deben a la formulación no optimizada para la concentración de proteínas más alta. El análisis FTIR de las muestras, tras la reconstitución, muestra que las bandas desaparecen en la solución y todas las muestras parecían similares en términos de su estructura secundaria.

50 Las propiedades de reconstitución de las muestras sometidas a estos ciclos diferentes se muestran en la Tabla 2 siguiente. El tiempo de reconstitución aumentó a velocidades de congelación más altas y el correspondiente vial parecía visualmente opalescente.

55

TABLA 2

Muestras	Tiempo de reconstitución (s)	Altura de la espuma (mm)	Comentarios
Hibridación a -12 °C , Enfriamiento a $0,7\text{ °C/min}$	$62,6 \pm 5,0$	$2,7 \pm 0,3$	Efervescencia observada al reconstituir. Inicialmente se observaron algunos pedazos, pero después se disolvieron.
Hibridación a -12 °C , Enfriamiento a $0,3\text{ °C/min}$	$70,0 \pm 4,8\text{ h}$	$2/4 \pm 0,8$	Relativamente más efervescencia atrapada en la solución observada al reconstituir.

Muestras	Tiempo de reconstitución (s)	Altura de la espuma (mm)	Comentarios
Hibridación a -12°C, enfriamiento con nitrógeno líquido	125,2 ± 7,2	2,5 ± 0,2	Capa de material sin disolver observada inicialmente encima de la solución. Se enturbió al reconstituir.

Ejemplo 13: Etanercept/Efectos del régimen de hibridación sobre la estructura, estabilidad y reconstitución

5 Muestras de 50 mg/7ml de etanercept se sometieron a liofilización con hibridación a 20 °C, -15 °C, -10 °C y -5 °C durante 5 horas usando el Ciclo 3 de la Tabla 1. Las muestras se estudiaron inmediatamente tras la liofilización y tras 1 y 3 meses de almacenamiento.

10 Todas las muestras hibridadas a -15 °C y -10 °C tenían una estructura de torta buena. Se observó un encogimiento leve de la torta en los viales hibridados a -20 °C y -5 °C.

El contenido en humedad de los viales se analizó usando análisis de Karl Fisher como se ha descrito anteriormente y espectroscopia NIR. Los resultados se muestran en la Tabla 3 que se expone a continuación.

TABLA 3

Ciclo de liofilización:	Humedad (tras la liofilización)	Humedad (almacenamiento 3 meses a 37 °C).	Humedad (almacenamiento 3 meses a 29 °C).
25 mg/ml Control	0,39 p/p	--	--
50 mg/ml -45 °C Etapa de desecación secundaria	0,81 % p/p	--	--
50 mg/ml -25 °C Etapa de desecación secundaria, -20 °C Hibridación	0,85 p/p	2,24 % p/p	2,08 p/p
50 mg/ml -25 °C Etapa de desecación secundaria, -15 °C Hibridación	1,03 % p/p	1,52 % p/p	1,83 % p/p
50 mg/ml -25 °C Etapa de desecación secundaria, -10 °C Hibridación	0,78 p/p	2,30 p/p	1,91 % p/p
50 mg/ml -25 °C Etapa de desecación secundaria, -5 °C Hibridación	0,9 p/p	1,33 % p/p	1,26 % p/p

15 El análisis FITR de las muestras en estado sólido inmediatamente tras la liofilización mostró que las estructuras secundarias eran las mismas para las muestras sometidas a las diferentes condiciones de hibridación. No obstante, diferían de las estructuras secundarias del control líquido u el material de partida (25 mg/ml de muestra lio), que exhiben pérdida en la banda de lámina b nativa y la aparición de bandas de lámina b intermolecular a 1615 cm⁻¹ y 1695 cm⁻¹. Inmediatamente tras la reconstitución, las disminuciones en la banda nativa y tanto las bandas en lámina b intermolecular en las muestras hibridadas desaparecieron y los espectros FTIR de todas las muestras hibridadas eran los mismos que los del control líquido y el material de partida.

25 El análisis DSC de las muestras en estado sólido muestra que la temperatura de cristalización de las muestras fue de aproximadamente 55 °C a 60 °C y las Tv fueron todas superiores a 120 °C. Por tanto, las diferentes condiciones de hibridación no afectan a la estructura y la estabilidad de la formulación observada inmediatamente tras la liofilización.

30 El cromatograma SE-HPLC mostró los picos característicos para los agregados de PMA, la proteína monomérica nativa y los fragmentos de PMB. La SE-HPLC de las muestras preparadas a las diferentes temperaturas de hibridación mostró más agregación de PMA que las muestras control, 1,5 % en comparación con 0,5 % en las muestras control. La cantidad de fragmentos de PMB no había aumentado en las muestras liofilizadas en comparación con la muestra control.

35 Las muestras liofilizadas se almacenaron durante 3 meses a tres temperaturas diferentes: 4° C, 29° C, y 37° C. No había pruebas visuales de colapso en cualquiera de las muestras en cualquiera de estas condiciones.

El contenido en humedad de las muestras tras la liofilización y tras 3 meses en almacenamiento a 29 °C y 37 °C se muestran más adelante en la Tabla 3. El contenido en humedad de las muestras liofilizadas de forma diferente y en los controles se determinó inmediatamente tras la liofilización y tras 3 meses de almacenamiento a 29 °C y 37 °C. Como se muestra en la Tabla 3, inmediatamente tras la liofilización, el contenido en humedad de las muestras hibridadas de forma diferente varió del 0,78 % p/p a 1,03 % p/p. Los controles fueron 0,39 % p/p y 0,81 % p/p. Tras 3 meses de almacenamiento, el contenido en humedad de todas las muestras aumentó algo a ambas temperaturas de almacenamiento.

El análisis de los espectros FTIR de las muestras de estado sólido no mostró cambios significativos de las muestras almacenadas durante 3 meses a 4 °C y 29 °C. No obstante, el análisis FTIR de las muestras hibridadas a -20 °C y almacenadas a 37 °C mostró un desplazamiento de la frecuencia de las líneas de absorción de la banda de lámina b, lo que indica un cambio en la estructura de la proteína preparada y almacenada en estas condiciones.

Las muestras almacenadas también se analizaron mediante SE-HPLC. El análisis se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente.¹¹ El análisis SE-HPLC mostró ligeras variaciones en la estabilidad de las muestras preparadas a las diferentes temperaturas de hibridación. En general, para una condición de almacenamiento dada, todas las muestras estaban en aproximadamente 1 % o menos una de otra. Se observó una pérdida gradual de la proteína nativa y la acumulación acompañante de PMB al aumentar el tiempo y al aumentar la temperatura.

Ejemplo 14: Etanercept/Efectos de la temperatura de desecación secundaria sobre la estructura, la estabilidad y la reconstitución

Se estudió el efecto de la liofilización de las muestras a dos temperaturas de desecación secundaria diferentes, 25 °C durante 9 horas o 45 °C durante 3 horas, sobre la estructura y reconstitución de las muestras. Los espectros FTIR de las muestras en estado sólido mostraron que la estructura secundaria de las muestras desecadas a 45 °C tenían una banda de lámina beta intramolecular menor a 1642 cm⁻¹. Las muestras desecadas a 45 °C también tenían un tiempo de reconstitución más largo y formaron una capa de espuma más espesa que las muestras desecadas a 25 °C. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

30

TABLA 4

Muestras	Tiempo de reconstitución	Altura de la espuma (mm)	Comentarios
Hibridación a -20°C, Desecación secundaria 45 °C	90 s	6,4 ± 0,8	Efervescencia observada al reconstituir. Se observaron algunos pedazos en el lateral del vial, pero después se disolvieron.
Hibridación a -20°C, Desecación secundaria 25 °C	41,6 ± 5,8	5,0 ± 1,4	Efervescencia observada al reconstituir. Inicialmente se observaron algunos pedazos, pero después se disolvieron.
Hibridación a -15°C, Desecación secundaria 25 °C	42,5 ± 4,5	4,8 ± 1,4	Efervescencia observada al reconstituir.
Hibridación a -10°C, Desecación secundaria 25 °C	68,3 ± 7,6	3,4 ± 2,2	Menor efervescencia la reconstituir en comparación con las otras dos condiciones. Lenta disolución de la torta.
Hibridación a -5°C, Desecación secundaria 25 °C	94,5 ± 5,0	2,9 ± 0,7	Menor efervescencia la reconstituir en comparación con las otras dos condiciones. Lenta disolución de la torta.

Ejemplo 15: Etanercept/Efectos de la desgasificación de la solución y el vacío

Los liofilizados se prepararon mediante el procedimiento descrito en el Ciclo 4 de la Tabla 1. La mitad de la formulación de la muestra se desgasificó antes de la liofilización. La otra mitad se trató exactamente del mismo modo, pero no se desgasificó antes de la liofilización. Algunas muestras se mantuvieron para hibridación a -12 °C, como se indica en el ciclo 4 del procedimiento. Otras muestras se mantuvieron a -15 °C. Las muestras se reconstituyeron al vacío o a presión atmosférica ambiental. Algunas muestras se reconstituyeron en diluyente antes de desgasificar. Otras muestras se reconstituyeron en el mismo diluyente después de desgasificar. Se observaron las propiedades de reconstitución de los liofilizados preparados de acuerdo con los procedimientos que incorporan uno o más de estos cambios. Las propiedades de reconstitución de estas muestras se compararon entre sí y con las propiedades de reconstitución de los liofilizados preparados exactamente como se ha descrito para el ciclo 4 en la Tabla 1. Todas las muestras se reconstituyeron en agua hasta una concentración de proteínas de 50 mg/ml.

35

40

Los tiempos de reconstitución variaron desde 45 segundos a 70 segundos. La altura de la espuma varió desde 1,6 mm a 6,5 mm. Una muestra exhibió efervescencia. Todas las muestras, excepto las indicadas más adelante, generaron espuma tras la reconstitución. Los resultados mejores se obtuvieron para material preparado a partir de la formulación de la muestra desgasificada mantenida a -12 °C para hibridar, que se reconstituyó al vacío usando diluyente desgasificado. Estas muestras se disolvieron completamente en aproximadamente 45 segundos, generaron muy poca espuma (altura de la espuma 1,6 mm o menos), exhibieron pocas burbujas o partículas y carecían de turbidez importante.

Los segundos resultados mejores se obtuvieron para muestras preparadas del mismo modo, excepto que la formulación de la muestra no se había desgasificado antes de la liofilización. Estas muestras tenían un tiempo de reconstitución de 65 segundos, generaron una capa fina de espuma (aproximadamente 2 mm) y exhibieron cantidades relativamente pequeñas de otras características indeseables.

Ejemplo 16: Etanercept/Efectos del ciclo de congelación sobre las propiedades de la torta liofilizada

Con el fin de entender las propiedades de la torta liofilizada en relación con la estabilidad y reconstitución del producto, los inventores analizaron las muestras usando estudios de difracción de rayos X (XRPD) y un microscopio electrónico de barrido. Los patrones de difracción en rayos X se obtuvieron de las muestras preparadas a diferentes temperaturas de hibridación, diferentes velocidades de congelación y diferentes temperaturas de desecación secundaria. Las muestras expuestas a mayores temperaturas de hibridación tenían picos de manitol cristalino más altos, siendo la forma β más predominante, que las realizadas a una hibridación a -20 °C. Asimismo, el pico de manitol hidrato disminuye cuando las muestras son sometidas a mayores temperaturas de hibridación.

A 45 °C de temperatura de desecación secundaria, la cantidad de una forma cristalina de manitol parecía incrementar, pero el pico del hidrato de manitol es mucho más pequeño que la muestra sometida a una temperatura de desecación secundaria de 25 °C. Las muestras sometidas a esta temperatura de desecación secundaria también hibridaron a -20 °C. Se observaron picos de manitol cristalino menores en las muestras sometidas a congelación en nitrógeno líquido.

Las micrografías de SEM correspondientes mostraron que las muestras que se reconstituyeron más rápido tenían una estructura más porosa en comparación con las muestras que se reconstituyeron más despacio.

El incremento de la concentración de sacarosa al 4 % produjo la formación de partículas planares grandes. Como resultado, estas muestras se reconstituyeron más despacio que los liofilizados preparados a partir de la formulación de TMS estándar.

Ejemplo 17: Etanercept/Resumen de los resultados

Las propiedades de reconstitución de las muestras de etanercept (50 mg/ml) liofilizadas usando una etapa de desecación secundaria a 25 °C son mejores que las de las muestras liofilizadas usando una etapa de desecación secundaria a 45 °C. Las propiedades de reconstitución de las muestras de etanercept (50 mg/ml) liofilizadas usando una etapa de hibridación a -12 °C son mejores que las de las muestras liofilizadas usando una etapa de hibridación a -20 °C. La hibridación posterior a la congelación elimina el efecto de las velocidades de congelación sobre la estructura del poro y, por tanto, sobre las propiedades de reconstitución de las tortas liofilizadas. La desgasificación de la formulación de la muestra y el diluyente y mantener la muestra al vacío en el vial de muestras mejora las propiedades de reconstitución de la torta de 50 mg/ml. El incremento de la concentración de sacarosa en la formulación liofilizada contribuye a tiempos de reconstitución más largos. Las propiedades de reconstitución de etanercept se correlacionan considerablemente con la cristalinidad de las muestras y la estructura de poro de la torta liofilizada. El uso de Tween 80 y Pluronic F68 en combinación en el diluyente mejora las propiedades de reconstitución.

Ejemplo 18: Fc-IL-1- α /Preparación de partida

El Fc-IL-1 α purificado se obtuvo como un líquido congelado de 100 mg/ml. Se dializó en el tampón de formulación antes de la liofilización.

Ejemplo 19: Fc-IL-1- α /Liofilización

Las muestras se liofilizaron en un liofilizador Virtis de acuerdo con el esquema general representado en la Figura 1 con los parámetros indicados en la Tabla 5, a menos que se indique lo contrario. Por tanto, la temperatura de hibridación fue de -12 °C, a menos que se indique lo contrario.

TABLA 5

Figura 1 de Referencia	Etapa	Parámetros
A	Concentración proteica inicial de Fc-IL-1-ra	100 mg/ml
A	Temperatura de carga	4°C
A	Etapa de congelación 1	Ninguno
B y C	Etapa de congelación 2	Subir 0,5 a -50 °C y retener durante 120 min
D y E	Etapa de hibridación 1	Subir 1,3 a -12 °C y retener durante 360 min
F y G	Etapa de hibridación 2	Subir 0,6 a -50 °C y retener durante 120 min
G	Evacuación de la cámara hasta el punto de presión fijado	100 mTorr
H	Etapa de desecación primaria 1	Subir 0,2 hasta -25 °C a 100 mTorr
I	Etapa de desecación primaria 2	Retener a -25 °C durante 1.600 min a 100 mTorr
J y K	Etapa de desecación secundaria	Subir 0,03 a 25 °C y retener durante 800 min a 50 mTorr
	Tiempo de desecación total	82,5 h

Ejemplo 20: Fc-IL-1-ra/Propiedades de reconstitución y estabilidad

5 La integridad de los liofilizados se determinó principalmente mediante el tiempo de reconstitución y mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaño en condiciones no desnaturalizantes (SE-HPLC).

10 El tiempo de reconstitución se determinó mediante el mismo procedimiento usado para medir el tiempo de reconstitución de etanercept, como se ha descrito anteriormente. La evaluación de la calidad se basó en la rapidez, finalización y fiabilidad de la reconstitución,

15 La SE-HPLC se llevó a cabo en una columna Toso Haas TSK-Gel G3000 SW xl (30 cm x 7,8 mm) con una fase móvil de fosfato potásico 50 mM, cloruro potásico 0,5M, EtOH al 5 %, pH 6,4, a un caudal de 0,5 ml/min. La SE-HPLC separó de forma fiable y eficiente las especies de degradación del Fc-IL-1 ra en función de sus diferencias en el peso molecular y la carga. Las áreas bajo los picos para la proteína intacta y el producto de degradación proporcionaron una medida cuantitativa de la estabilidad.

20 Otros procedimientos que se pueden usar para resolver las especies moleculares resultantes de la degradación de Fc-IL-1 ra a este respecto incluyen SE-HPLC con desnaturalización, HPLC de intercambio de cationes, HPLC de intercambio aniónico y SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras.

Ejemplo 21: Fc-IL-1-ra/Degradación

25 En estudios previos se ha demostrado que Fc-IL-1 ra es propenso a la degradación tanto física como química. El mecanismo de degradación principal que ha evitado que la molécula se formule como un líquido es la agregación (tanto covalente como no covalente). Otras formas minoritarias de degradación incluyen degradación química detectada mediante la pérdida del pico principal mediante HPLC de intercambio catiónico.

30 Fc-IL-1 ra en los liofilizados obtenido usando el Ciclo 4 como se ha descrito anteriormente era intacto y estable.

Ejemplo 22: Agentes espesantes

35 Se estudiaron los efectos de los agentes espesantes sobre los liofilizados de Fc-IL-1 ra. Se encontró que el manitol estimulaba tiempos de reconstitución más cortos que la glicina. Los mejores resultados a este respecto se obtuvieron con 4 % de manitol. El 4 % de manitol también produjo la mejor cristalinidad hibridando a tres temperaturas diferentes (11° C, -13° C, y -12° C). La cristalinidad se correlacionó directamente con la facilidad de reconstitución. Los mejores resultados en estos experimentos se obtuvieron con 4 % de manitol y una temperatura de hibridación de -11 °C.

40 No obstante, las formulaciones con 4 % de manitol tenían una osmolaridad relativamente alta (369 mOsm). Además, en formulaciones isotónicas (aproximadamente 300 mOsm), la concentración de manitol también correspondía directamente a la cantidad de pérdida del pico principal determinada mediante SEC. A este respecto, el 4 % de manitol mostró la pérdida más alta del pico principal de estas concentraciones de manitol analizadas.

45 De acuerdo con esto, la concentración de manitol para usar con Fc-IL-1 ra se seleccionó para equilibrar estos dos efectos opuestos de mantener la estabilidad y proporcionar las propiedades de reconstitución adecuadas al tiempo que se mantiene una osmolaridad casi fisiológica. De acuerdo con realizaciones preferidas de la invención a este respecto, la concentración de manitol está entre 3,0 % y 4,0 %. Concentraciones particularmente preferidas están

entre 3,0 % y 3,8 %. Concentraciones especialmente preferidas están entre 3,0 % y 3,6 %. Especialmente altamente preferida es la concentración de manitol de 3,3 %.

Ejemplo 23: Fc-IL-1-ra/Estabilizantes y lioprotectores

5 Se analizó los efectos estabilizantes de sacarosa, trehalosa y arginina HCl sobre el Fc-IL-1 ra. Tanto la sacarosa como la trehalosa proporcionaron efectos estabilizantes comparables en estado sólido. Otros resultados indicaron que la arginina HCl podría proporcionar mejor estabilidad en estado sólido.

10 Estabilizantes preferidos de acuerdo con la invención a este respecto incluyen sacarosa y arginina HCl. Entre las formulaciones particularmente preferidas están 2% de sacarosa y 0,7 % de arginina HCl (35 mM).

Ejemplo 24: Tampones y pH

15 Se estudiaron los efectos de varios sistemas tampón sobre las propiedades del liofilizado y en la reconstitución. En concreto se usaron histidina y glutamina a concentraciones de 10 mM and 20 mM como soluciones tampón a una serie de pH entre 4,0 y 5,5. Las muestras preparadas con el tampón glutamato exhibieron tiempos de reconstitución de 4 a 5 minutos más largos que los de las muestras preparadas usando histidina. El tampón a pH 4,5 y 5,0 minimizó mejor la agregación durante el almacenamiento en estado sólido. A una concentración de histidina de 20 mM, la estabilidad en estado sólido mejoró espectacularmente, acompañada de un incremento relativamente pequeño de la osmolaridad. A 20 mM, la estabilidad en estado sólido de la histidina fue mejor a pH 5,0 que a pH 4.5. (Debido a la capacidad tampón intrínseca de la proteína, dializar la proteína contra un tampón a pH 5,0 produjo formulaciones que tenían un pH final de 5,3 a 5,4).

Ejemplo 25: Fc-IL-1-ra/Tensioactivos

La adición de polisorbato en la forma de dosificación final disminuyó el tiempo de disipación de las burbujas tras la reconstitución y minimizó la agregación que se produjo durante la liofilización y/o reconstitución. Al contrario que las propiedades de estabilidad preliofilización se requirió una concentración mínima de polisorbato para una estabilidad adecuada del líquido tras la reconstitución para las formulaciones de sacarosa, lo que sugiere que se había producido algún daño durante la liofilización y/o reconstitución para dicha formulación. El polisorbato 80 y el polisorbato 20 se comportaron de forma comparable.

Ejemplo 26: Estabilidad de Etanercept en el tiempo

35 Etanercept a una concentración de 50 mg/ml en 12 mg/ml de Tris, 40 mg/ml de manitol y 10 mg/ml de sacarosa a pH 7,4 se liofilizó, como se ha descrito anteriormente, con hibridación a -1,2° C durante 120 minutos y desecación primaria a 0° C durante 1080 minutos a 150 mTorr. La liofilización se realizó en un liofilizador comercial (Edwards 0,6 Lyoflex). Se introdujeron termopares en los frascos de forma individual. Los estantes se enfriaron previamente hasta 5 °C y los viales se equilibraron a la misma temperatura antes de la cristalización en frío y la congelación. El estante se superenfrió hasta -50 °C. Después, se elevó la temperatura hasta la temperatura de hibridación (-12 °C) y se mantuvo así durante 120 minutos. Después, se disminuyó la temperatura de nuevo hasta -50 °C y se mantuvo a dicha temperatura el tiempo suficiente para equilibrar las muestras. Después, la temperatura se subió a la temperatura de desecación primaria (0 °) a presión controlada y se mantuvo a la temperatura de desecación primaria a presión controlada durante 1.080 minutos. Tras esto, la temperatura se subió a la temperatura de desecación secundaria (25 °C) a presión controlada y se mantuvo así a presión controlada hasta que la desecación se completó. Al final del ciclo de desecación, los viales se taparon a 150 mTorr y después se almacenaron.

50 Las muestras se reconstituyeron in situ mediante la adición de agua. La reconstitución se evaluó mediante inspección visual y absorbancia UV, como se ha descrito en otros lugares del presente documento. Se usó un coeficiente de extinción a DO_{280} de 1,14 para una solución de 1 mg/ml de etanercept para calcular el grado de reconstitución. La altura de la espuma se evaluó mediante inspección visual y la calibración usando compás digital, como se ha descrito en otros lugares del presente documento.

55 La estabilidad de etanercept en el liofilizado se determinó a varios puntos de tiempo para almacenamiento a varias temperaturas. La estabilidad se evaluó para todas las muestras mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento de exclusión por tamaño ("SE-HPLC"). En resumen, 100 microgramos de cada muestra se desnaturalizaron y redujeron en guanidina HCl y etc., y, después, se alquiló con yodoacetamida. Aproximadamente 30 microgramos de una muestra reducida y alquilada se analizaron en columnas TosoHaas TSK G3000 SWx1 en tándem y se eluyó isocráticamente con guanidina-HCl 2,5 M, fosfato sódico 100 mM a pH 6,5 a un caudal de 0,6 ml/min durante 45 minutos. Los picos se detectaron mediante absorbancia a 215 nm. Las cantidades de los fragmentos, monómeros intactos y las proteínas de peso molecular alto mal plegadas se calcularon a partir de las áreas de los picos detectados.

65 Los resultados representativos se representan en la Figura 2, que muestra que etanercept preparado como se ha descrito anteriormente es estable durante periodos extendidos de almacenamiento a temperaturas tanto reducidas

como elevadas.

Ejemplo 27: Uso de espectroscopia de Raman para determinar los polimorfos

- 5 Los polimorfos de manitol (cristalino alfa, manitol beta y delta, manitol hidrato y manitol amorfo) se determinaron en formulaciones de etanercept durante la liofilización en tiempo real mediante los espectros normalizados de Raman de segunda derivada usando un algoritmo de mínimos cuadrados parciales ("PLS") (también denominados en el presente documento "PLS de Raman" y "Espectroscopia de PLS de Raman" y similares).
- 10 Los espectros de Raman se adquirieron con un sistema de espectroscopia de Raman ChemImage Corporation FALCON IITM Molecular Chemical Imaging (MCI) usando un haz de excitación a 532 nm de un láser Spectra Physics Millennia II Laser Source. La muestra se colocó en una plataforma de un microscopio Olympus Modelo BX51 (véase más adelante). El haz de excitación del láser se centró en la muestra a través de un objetivo 20x. El haz centrado cubrió un área circular con un diámetro de aproximadamente 154 μm . Los espectros se adquirieron a través de una rejilla con 300 ranuras/mm, que proporcionaron una ventana de señal amplia para las bandas de Raman. Las señales se detectaron en un CCD con retroiluminación (1340 x 100 píxeles) operado a $-40\text{ }^\circ\text{C}$.

- 20 La muestra se mantuvo en el estado en un criostato de liofilización Linkman Scientific Instruments, Ltd. FDCS 196 "cryostage") modificado para acoplarlo al sistema de espectroscopia de Raman. La etapa proporcionó el control de temperatura y presión, respectivamente, -196 a $125\text{ }^\circ\text{C}$ y de 50 mTorr a 750 Torr. Los espectros de Raman se adquirieron de muestras *in situ* a través de una ventana de cristal en la parte superior del criostage.

- 25 En resumen, el procedimiento implica: obtener un espectro de Raman para cada forma polimorfo sobre un amplio rango; normalizar los espectros de Raman contra su tira $-\text{CH}$ a aproximadamente 2.800 cm^{-1} ; derivar los espectros derivados para los espectros normalizados; simular de forma computacional un conjunto de espectros mediante adición lineal de los espectros derivados normalizados; generar un procedimiento de cuantificación usando el algoritmo de los Mínimos Cuadrados Parciales y el conjunto de calibración; y, después, aplicar el procedimiento al espectro de Raman de una muestra para calcular las cantidades relativas de los polimorfos en el mismo.

- 30 La Figura 3 ilustra la capacidad del procedimiento para determinar individualmente los cinco polimorfos de manitol en tiempo real en condiciones de liofilización diferentes.

- 35 La Figura 6 muestra la relación entre el tiempo de reconstitución y el porcentaje de manitol hidrato (círculos) y el porcentaje de delta manitol (triángulos) para varias formulaciones relacionadas. Los polimorfos se determinaron usando el procedimiento de Raman descrito anteriormente. Los tiempos de reconstitución se determinaron como se ha descrito en otros lugares del presente documento.

- 40 La Figura 7 ilustra la relación entre la altura de la espuma y el porcentaje de manitol hidrato para varias formulaciones relacionadas. Los porcentajes del manitol hidrato se determinaron mediante el procedimiento de Raman descrito anteriormente. Las alturas de la espuma se determinaron como se ha descrito en otros lugares del presente documento.

- 45 Como se ilustra en este Ejemplo, el procedimiento es útil para, entre muchas otras cosas, obtención de imágenes en tiempo real y cuantificación de la distribución de los polimorfos en una muestra durante la liofilización, en particular, por ejemplo, para observar su cristalización y transformación durante un procedimiento de liofilización.

Ejemplo 28: Reconstitución de Etanercept y altura de la espuma como función de la concentración de manitol a dos temperaturas de hibridación

- 50 Las soluciones de etanercept que contienen varias concentraciones de manitol se prepararon, liofilizaron y reconstituyeron como se ha descrito anteriormente. Los tiempos de reconstitución y las alturas de la espuma se determinaron de acuerdo con los procedimientos descritos en otros lugares del presente documento. Los resultados se representaron gráficamente en la Figura 4.

- 55 Como se ve en el gráfico, se observaron tiempos de reconstitución más rápidos para las muestras hibridadas a $-12\text{ }^\circ\text{C}$, después para las hibridadas a $-15\text{ }^\circ\text{C}$. Los tiempos de reconstitución para las muestras hibridadas a ambas temperaturas permanecieron iguales de 2 % a 1,5 % de manitol. No obstante, se observó una brusca disminución del tiempo de reconstitución a 2,5 % - 2,6 % de manitol para las muestras hibridadas a $-12\text{ }^\circ\text{C}$ en hibridación y a 2,4 % - 2,5 % de manitol para las muestras hibridadas a $-15\text{ }^\circ\text{C}$. Para ambas condiciones de hibridación los tiempos de reconstitución permanecieron por encima de 3,5 % de manitol.

Las alturas de la espuma para todas las muestras fueron inversamente proporcionales al tiempo de reconstitución.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un liofilizado que comprende una proteína y manitol, en el que el manitol está compuesto por al menos 70 % de delta manitol, no más del 20 % de manitol hidrato y no más del 10 % de manitol amorfo, en el que el área de superficie del liofilizado es igual o superior a 1,2 m²/g.
- 10 2. Un liofilizado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el manitol está compuesto por al menos 70 % de delta manitol, no más del 10 % de manitol amorfo y no más del 20 % de manitol hidrato más alfa manitol más beta manitol.
- 15 3. Un liofilizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende sacarosa.
4. Un liofilizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende un tensioactivo
- 20 5. Un liofilizado de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 que además comprende uno o más de un agente espesante, un agente estabilizante, un lioprotector o un tensioactivo.
- 25 6. Un liofilizado de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que la proteína es un anticuerpo o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo.
7. Un liofilizado de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado, o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo.
- 30 8. Un liofilizado de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado.
9. Un liofilizado de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que la proteína comprende una región de un anticuerpo humano o humanizado, o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo.
- 35 10. Un liofilizado de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la región es una región Fc, o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma.
11. Un liofilizado de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la región es una región Fc.
- 40 12. Un liofilizado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la proteína es un pepticuerpo.
13. Un liofilizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la proteína de fusión que comprende una región Fc de un anticuerpo o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma, y un resto de unión a TNF de un receptor de TNF, o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma;
- 45 14. Un liofilizado de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la proteína es una proteína de fusión que comprende una región Fc de un anticuerpo humano o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma, y un resto de unión a TNF de un receptor de TNF alfa humano, o una variante, derivado, fragmento o mimético de un receptor de TNF alfa humano.
- 50 15. Un liofilizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la proteína es una proteína de fusión que comprende una región Fc de un anticuerpo o una variante, derivado, fragmento o mimético de la misma, y un resto de unión a IL-1 de un ligando proteico de un receptor de IL-1, o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo.
- 55 16. Un liofilizado de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la proteína es una proteína de fusión que comprende una región Fc de un anticuerpo humano o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo, y el resto de unión al receptor de IL-1 de un ligando proteico del receptor de IL-1.
- 60 17. Un liofilizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la proteína es una proteína de fusión que comprende una región Fc de un anticuerpo humano o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo, y el resto de unión al receptor de IL-1 de un antagonista del receptor de IL-1.
- 65 18. Un liofilizado de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la proteína es una proteína de fusión que comprende una región Fc de un anticuerpo humano o una variante, derivado, fragmento o mimético del mismo, y el resto de unión al receptor de IL-1 del antagonista de la proteína IL-1 ra humana del receptor de IL-1.
19. Un liofilizado de acuerdo con la reivindicación 18, en el que la proteína es región es Fc-I L-1 ra.

Figura 1

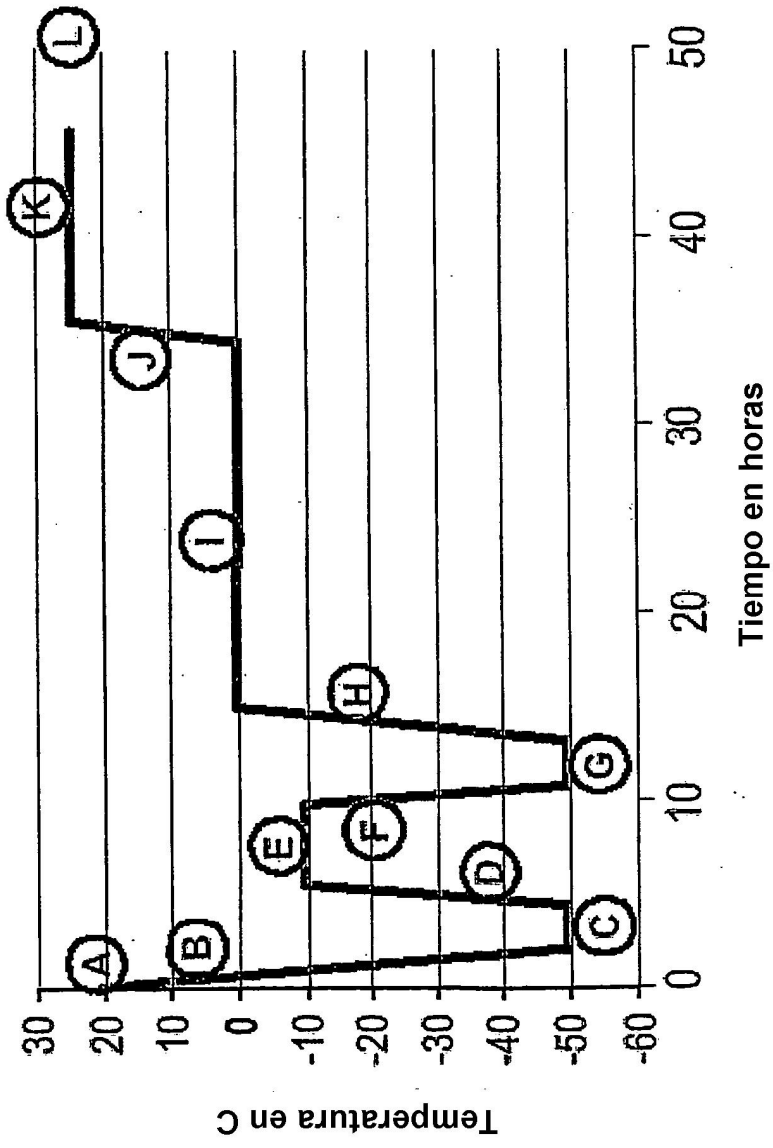


FIGURA 2

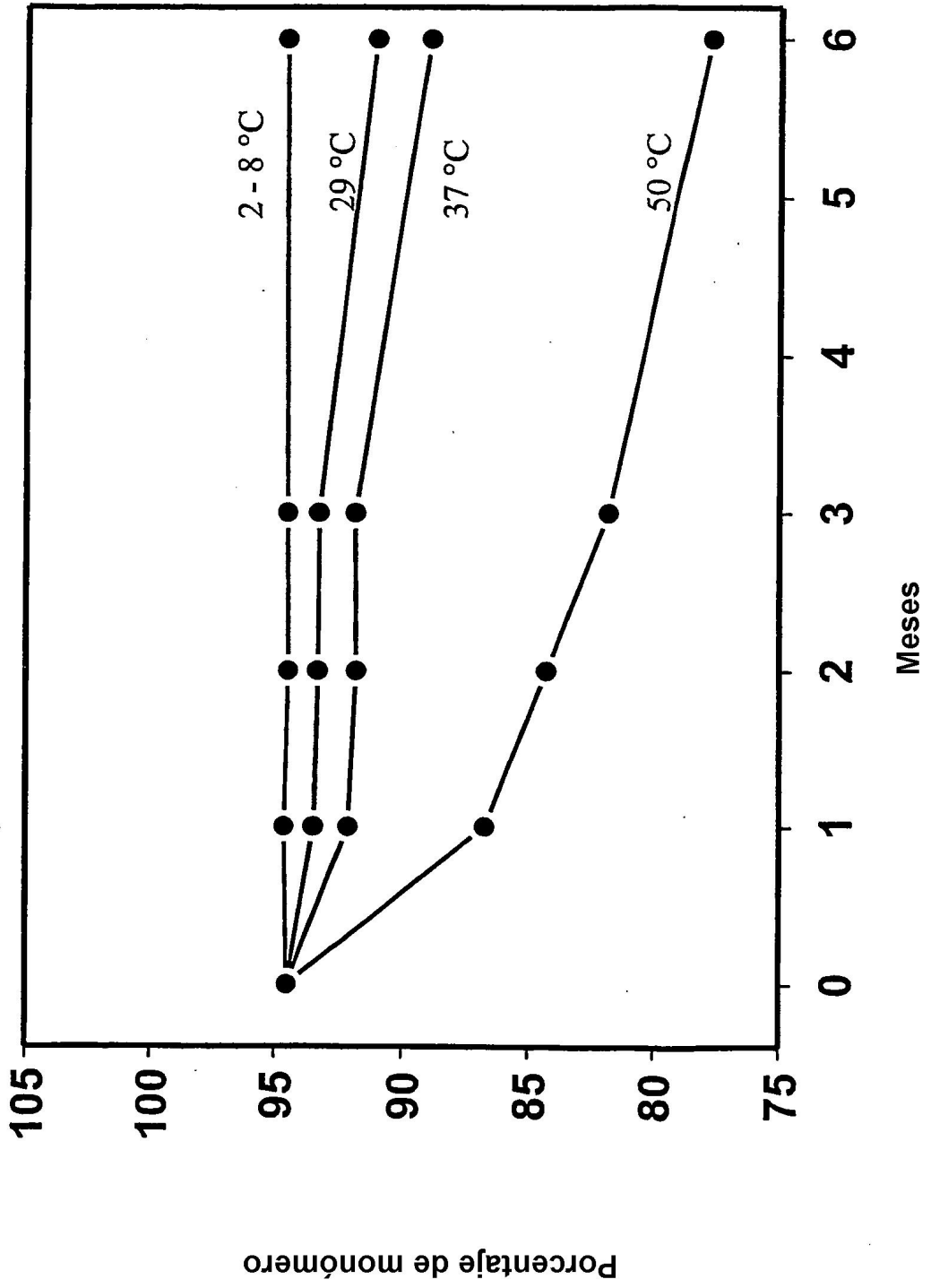


FIGURA 3

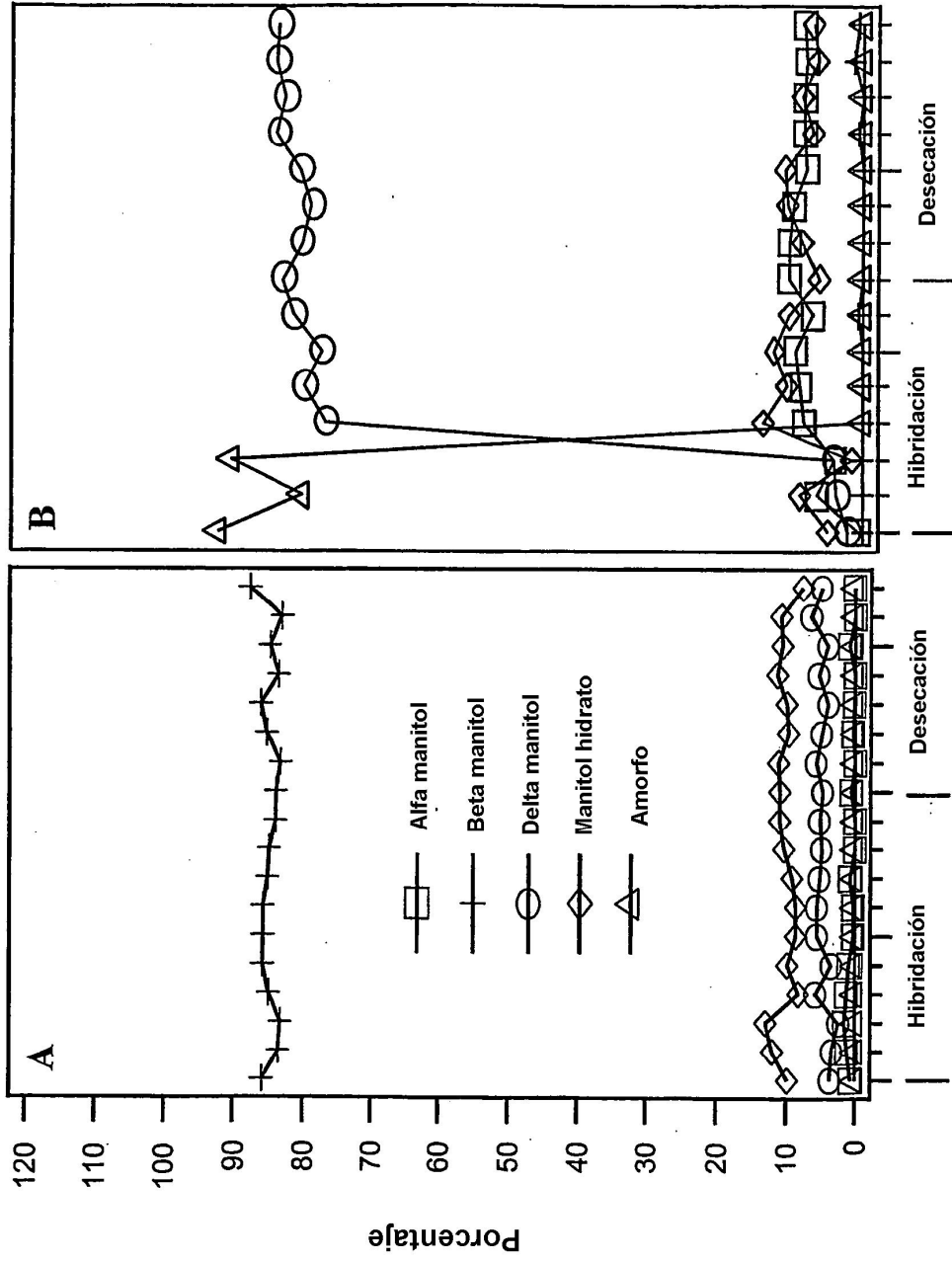


FIGURA 4

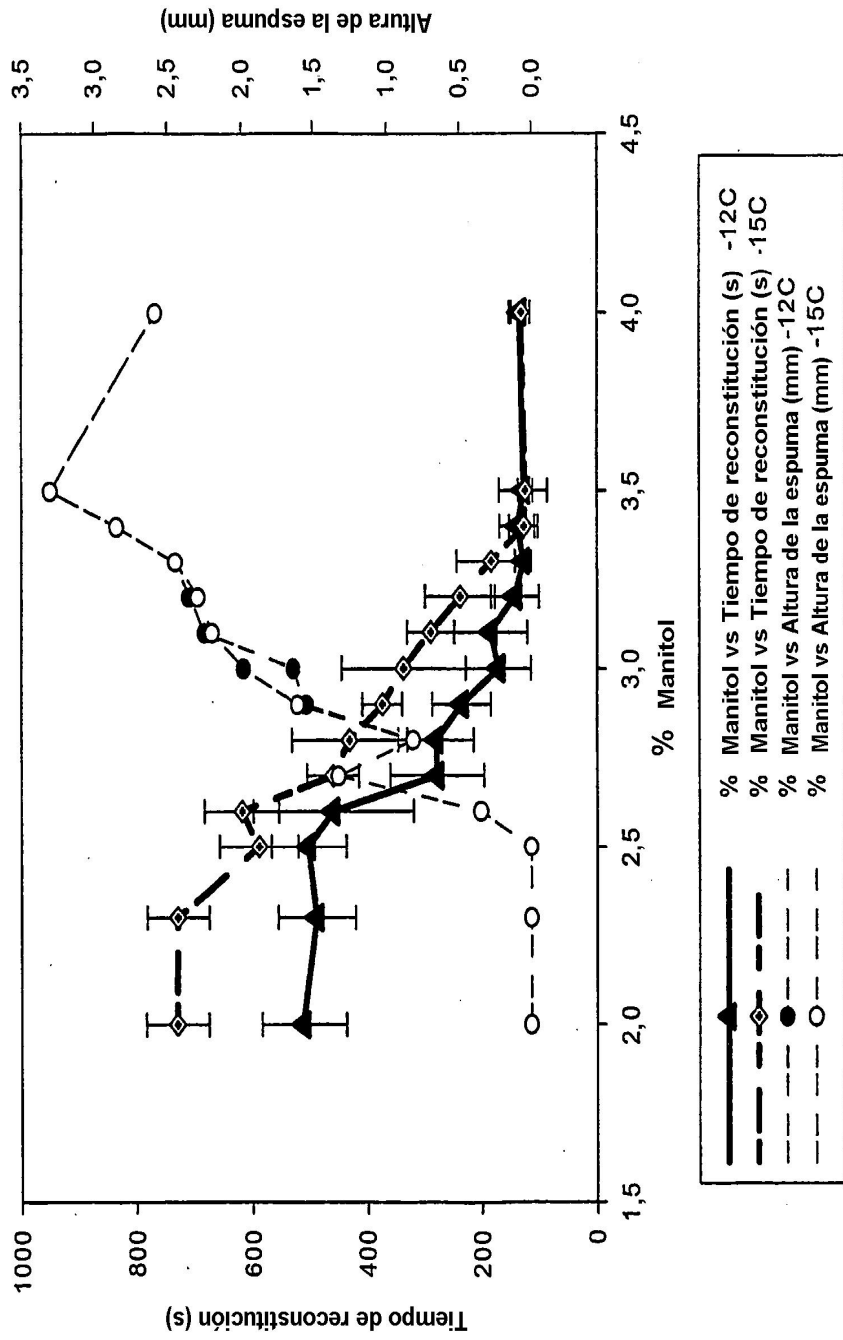


FIGURA 5

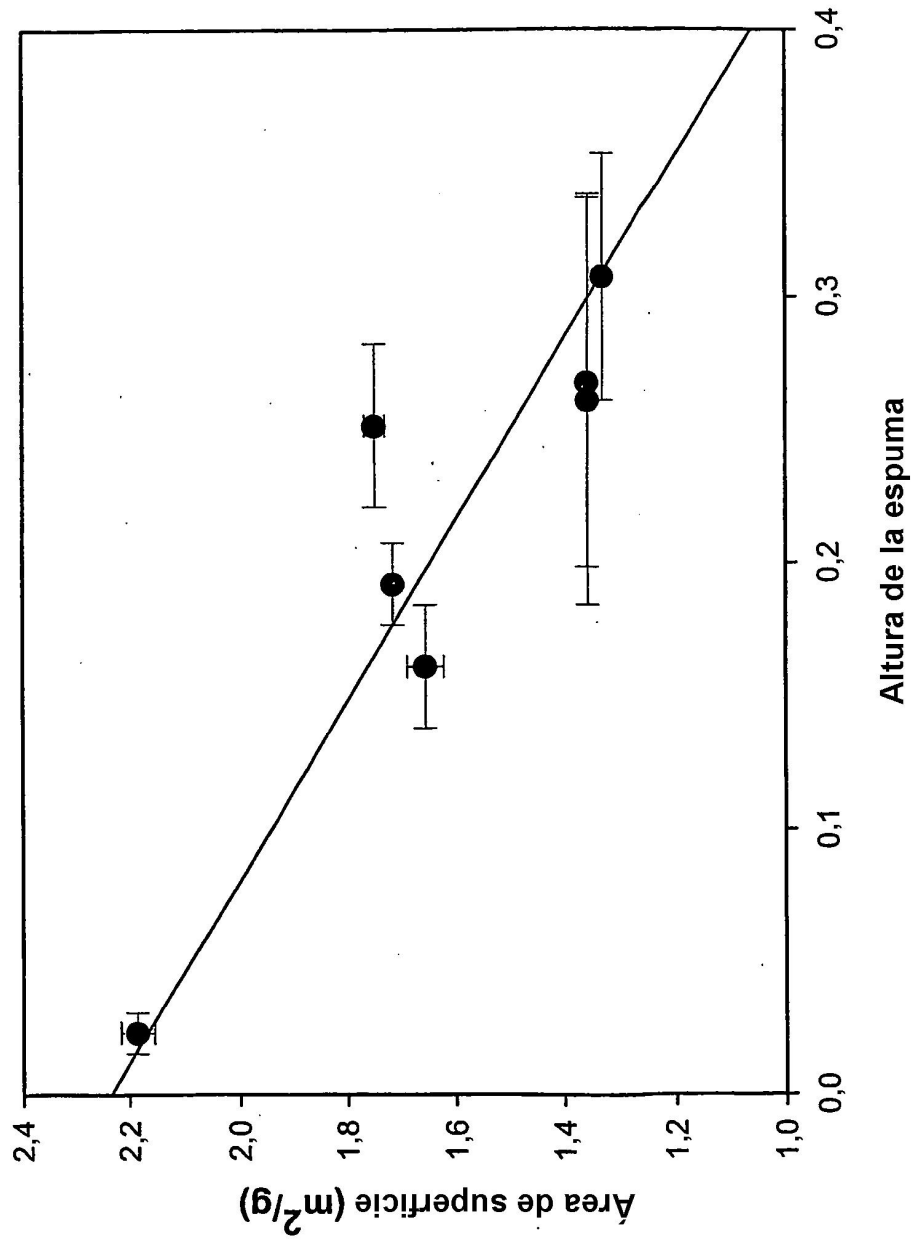


FIGURA 6

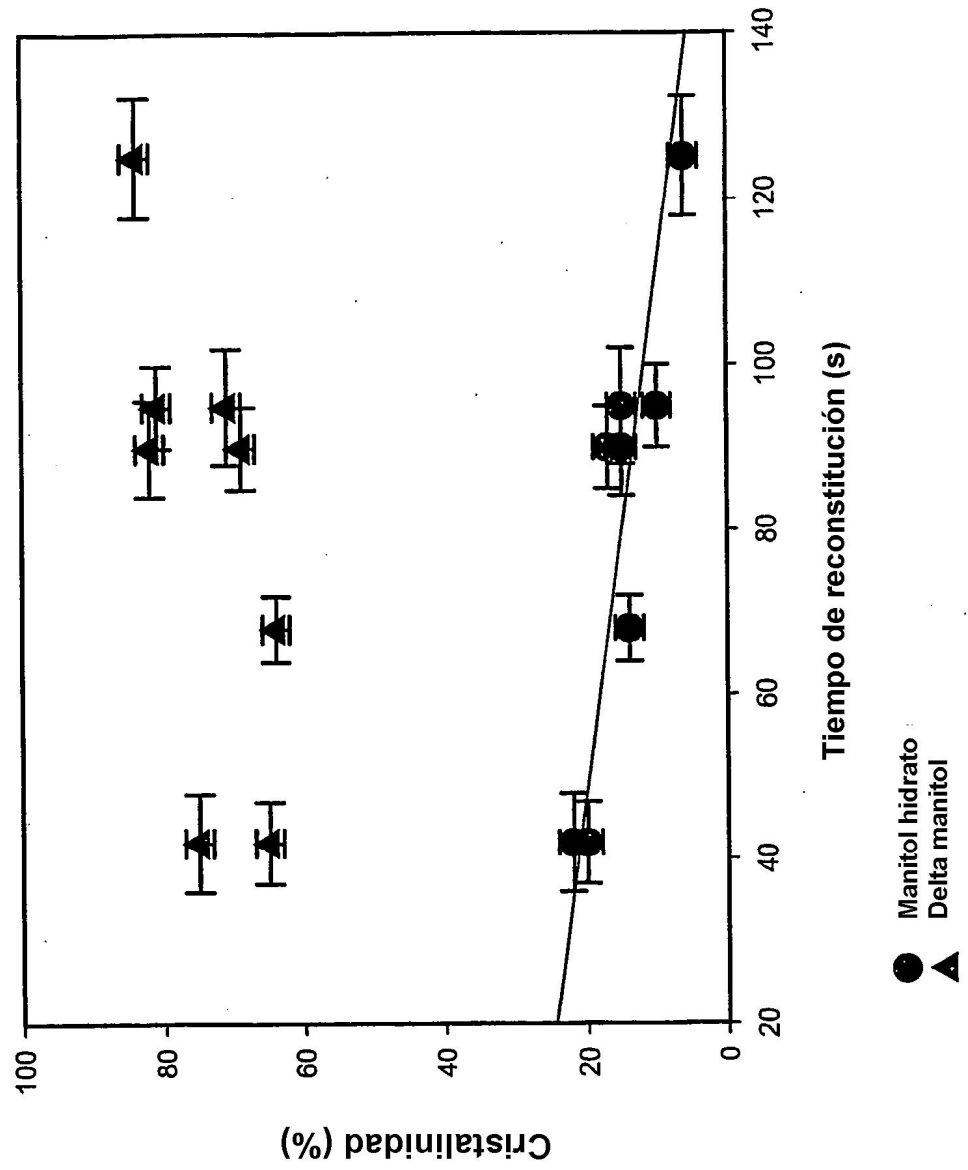


FIGURA 7

