

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 616**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2006 E 06846683 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013 EP 1962886**

54 Título: **Formulaciones proteicas estables**

30 Prioridad:

20.12.2005 US 752150 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.01.2014

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543-4000, US**

72 Inventor/es:

**DALI, MANISHA M.;
DAHLHEIM, CHARLES E.;
BORSADIA, SUNITA;
NARINGREKAR, VIJAY H.;
GANDHI, RAJESH B. y
NERURKAR, MANOJ**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 436 616 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

Formulaciones proteicas estables

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a formulaciones estables que comprenden moléculas CTLA4Ig, incluyendo formulaciones líquidas adecuadas para administración por una vía subcutánea (SC).

Antecedentes de la invención

10 Durante las últimas dos décadas, la tecnología de ADN recombinante ha conducido a la comercialización de muchos productos terapéuticos proteicos. La vía más convencional de suministro para fármacos proteicos ha sido la administración intravenosa (IV) debido a la escasa biodisponibilidad por la mayoría de las otras vías, mayor control durante la administración clínica, y desarrollo farmacéutico más rápido. Para productos que requieren administración frecuente y crónica, la vía subcutánea alternativa (SC) de suministro es más atractiva. Cuando se acompaña de jeringa precargada y tecnología de dispositivo autoinyector, el suministro SC permite la administración doméstica y mejor conformidad de administración.

15 Los tratamientos con dosis altas de más de 1 mg/kg o 100 mg por dosis con frecuencia requieren desarrollo de formulaciones a concentraciones que exceden 100 mg/ml debido al pequeño volumen (<1,5 ml) que puede proporcionarse por las vías SC. Para proteínas que tienen una propensión a agregarse a las mayores concentraciones, conseguir dichas formulaciones de alta concentración es un reto de desarrollo. Incluso para la vía de suministro IV, en la que pueden administrarse grandes volúmenes, pueden ser necesarias concentraciones de proteína de decenas de miligramos por mililitro para regímenes de alta dosificación y esto puede presentar retos de estabilidad para algunas proteínas.

20 Los principios que gobiernan la solubilidad proteica son más complicados que los de moléculas sintéticas pequeñas, y por lo tanto superar el problema de la solubilidad proteica requiere diferentes estrategias. Operativamente, la solubilidad para proteínas podría describirse por la máxima cantidad de proteína en presencia de cosolutos por lo que la solución permanece visiblemente transparente (es decir, no muestra precipitados proteicos, cristales o geles).
25 La dependencia de la solubilidad proteica en la fuerza iónica, forma salina, pH, temperatura y ciertos excipientes se ha explicado mecánicamente por cambios en la tensión superficial de agua en bruto y unión proteica al agua e iones frente a autoasociación por Arakawa y col en Theory of protein solubility, Methods of Enzymology, 114: 49- 77, 1985; Schein in Solubility as a function of protein structure and solvent components, BioTechnology 8 (4) : 308- 317, 1990; Jenkins en Three solutions of the protein solubility problem, Protein Science 7 (2): 376- 382, 1998; y otros. La unión
30 de proteínas con excipientes específicos o sales influye en la solubilidad mediante cambios en la conformación proteica o enmascaramiento de ciertos aminoácidos implicados en la autointeracción. Las proteínas también preferentemente se hidratan (y se estabilizan como conformaciones más compactas) por ciertas sales, aminoácidos y azúcares, lo que conduce a su solubilidad alterada.

35 Se espera que la agregación que requiere colisión bimolecular sea la principal ruta de degradación en soluciones proteicas. La relación de la concentración con la formación de agregados depende del tamaño de los agregados así como del mecanismo de asociación. La agregación proteica puede dar como resultado asociación covalente (por ejemplo, ligada a disulfuro) o no covalente (reversible o irreversible). La agregación irreversible por asociación no covalente generalmente se produce mediante regiones hidrófobas expuestas por procesos térmicos, mecánicos o químicos que alteran la conformación nativa de una proteína. La agregación proteica puede influir en la actividad
40 proteica, farmacocinética y seguridad, por ejemplo, debido a la inmunogenicidad.

45 Un enfoque típico para minimizar la agregación es restringir la movilidad de las proteínas para reducir el número de colisiones. La liofilización con excipientes apropiados puede mejorar la estabilidad proteica frente a agregación reduciendo la movilidad proteica y restringiendo la flexibilidad conformacional con el beneficio añadido de minimizar las reacciones hidrolíticas posteriores a la retirada del agua. La adición de excipientes apropiados, incluyendo lioprotectores, puede evitar la formación de agregados durante el procedimiento de liofilización así como durante el almacenamiento del producto final. Un parámetro clave para protección eficaz es la relación molar del lioprotector y la proteína. Generalmente se requieren relaciones molares de 300:1 o mayores para proporcionar estabilidad adecuada, especialmente para almacenamiento a temperatura ambiente. Dichas relaciones también pueden, sin embargo, conducir a un aumento indeseable de la viscosidad.

50 La liofilización permite diseñar una formulación con estabilidad y tonicidad apropiadas. Aunque no se requiere necesariamente isotonicidad para administración SC, puede ser deseable para minimizar el dolor tras su administración. La isotonicidad de un liófilo es difícil de conseguir porque tanto la proteína como los excipientes se concentran durante el proceso de reconstitución. Las relaciones molares de excipientes:proteína de 500:1 dará como resultado preparaciones hipertónicas si la concentración de proteína total se dirige a más de 100 mg/ml. Si se desea
55 conseguir una formulación isotónica, entonces una elección de relación molar menor de excipiente:proteína dará como resultado una formulación potencialmente menos estable.

La determinación de la mayor concentración proteica obtenible sigue siendo un ejercicio empírico debido a la naturaleza lábil de la conformación proteica y la propensión a interactuar consigo misma, con superficies y con solutos específicos.

5 Los ejemplos de sujetos que pueden beneficiarse de formulaciones SC son los que tienen afecciones que requieren administración frecuente y crónica tales como sujetos con la enfermedad del sistema inmunitario artritis reumatoide y trastornos inmunitarios asociados con trasplante de injertos. Los productos farmacológicos proteicos disponibles en el mercado para tratamiento de artritis reumatoide incluyen HUMERA[®], ENBREL[®] y REMICADE[®].

10 HUMIRA[®] (Abbott) se proporciona en jeringas de vidrio precargadas de 1 ml, de uso único, como una solución estéril, sin conservantes para administración subcutánea. La solución de HUMIRA[®] es transparente e incolora, con un pH de aproximadamente 5,2. Cada jeringa suministra 0,8 ml (40 mg) de producto farmacológico. Cada 0,8 ml de HUMIRA[®] contiene 40 mg de adalimumab, 4,93 mg de cloruro sólido, 0,69 mg de fosfato sódico monobásico dihidrato, 1,22 mg de fosfato sódico dibásico dihidrato, 0,24 mg de citrato sódico, 1,04 mg de ácido cítrico monohidrato, 9,6 mg de manitol, 0,8 mg de polisorbato 80 y Agua para inyección, USP. Se añade hidróxido sódico según sea necesario para ajustar el pH.

15 ENBREL[®] (Amgen) se proporciona en una jeringa de 1 ml precargada de uso único, como una solución estéril, sin conservantes para inyección subcutánea. La solución de ENBREL[®] es transparente e incolora y se formula a pH 6,3 ± 0,2. Cada jeringa precargada de uso único de ENBREL[®] contiene 0,98 ml de una solución de 50 mg/ml de etanercept con sacarosa 10 mg/ml, cloruro sódico 5,8 mg/ml, clorhidrato de L-arginina 5,3 mg/ml, fosfato sódico monobásico monohidrato 2,6 mg/ml y fosfato sódico dibásico anhídrido 0,9 mg/ml. La administración de una jeringa
20 precargada de ENBREL[®] 50 mg/ml proporciona una dosis equivalente a dos viales de 25 mg de ENBREL[®] liofilizado, cuando los viales se reconstituyen y administran como se recomienda. El vial de uso múltiple ENBREL[®] contiene polvo liofilizado estéril, blanco, sin conservantes. La reconstitución con 1 ml del Agua para Inyección Bacteriostática Estéril (BWF) proporcionada, USP (que contiene alcohol bencílico 0,9 %) produce una solución de uso múltiple,
25 transparente e incolora con un pH de 7,4 ± 0,3 que contiene 25 mg de etanercept, 40 mg de manitol, 10 mg de sacarosa y 1,2 mg de trometamina.

REMICADE[®] (Centocor) se proporciona como un polvo liofilizado, blanco, estéril para infusión intravenosa. Después de reconstitución con 10 ml de Agua Estéril para inyección, USP, el pH resultante es de aproximadamente 7,2. Cada frasco de uso individual contiene 100 mg de infliximab, 500 mg de sacarosa, 0,5 mg de polisorbato 80, 2,2 mg de fosfato sódico monobásico, monohidrato, y 6,1 mg de fosfato sódico dibásico, dihidrato. No están presentes
30 conservantes.

Los productos farmacológicos proteicos disponibles en el mercado para el tratamiento de trastornos inmunitarios asociados con trasplante de injertos incluyen SIMULECT[®] y ZENAPAX[®].

35 El producto farmacológico, SIMULECT[®] (Novartis), es un liofilizado estéril que está disponible en viales de vidrio incoloros de 6 ml y está disponible en dosis de 10 mg y 20 mg. Cada vial de 10 mg contiene 10 mg de basiliximab, 3,61 mg de fosfato potásico monobásico, 0,50 mg de hidrógeno fosfato disódico (anhídrido), 0,80 mg de cloruro sódico, 10 mg de sacarosa, 40 mg de manitol y 20 mg de glicina, para reconstituir en 2,5 ml de agua estéril para inyección, USP. Cada vial de 20 mg contiene 20 mg de basiliximab, 7,21 mg de fosfato potásico monobásico, 0,99 mg de hidrógeno fosfato disódico (anhídrido), 1,61 mg de cloruro sódico, 20 mg de sacarosa, 80 mg de manitol y 40 mg de glicina, para reconstituir en 5 ml de agua estéril para inyección, USP. No se añaden conservantes.

40 ZENAPAX[®] (Roche Laboratories), 25 mg/5 ml, se proporciona como un concentrado transparente, estéril, incoloro para dilución adicional y administración intravenosa. Cada mililitro de ZENAPAX[®] contiene 5 mg de daclizumab y 3,6 mg de fosfato sódico monobásico monohidrato, 11 mg de fosfato sódico dibásico heptahidrato, 4,6 mg de cloruro sódico, 0,2 mg de polisorbato 80 y puede contener ácido clorhídrico o hidróxido sódico para ajustar el pH a 6,9. No se añaden conservantes.

45 Las moléculas CTLA4Ig interfieren con la coestimulación de linfocitos T inhibiendo la interacción CD28-B7. Por lo tanto, las moléculas CTLA4Ig pueden proporcionar un uso terapéutico para enfermedades del sistema inmunitario, tales como artritis reumatoide y trastornos inmunitarios asociados con trasplante de injertos.

50 El documento WO 02/02638A describe composiciones que comprenden moléculas de CTLA4 solubles (es decir moléculas CTLA4Ig o L104EA29YIg), y una diversidad de vehículos o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Se describen adicionalmente frascos de vidrio de uso único que contienen 200 mg/vial de CTLA4Ig o 100 mg/vial de L104EA29YIg y la dilución de dichas moléculas CTLA4Ig con agua para inyección hasta una concentración final de 25 mg/ml.

El documento WO 02/058729A describe composiciones farmacéuticas que comprenden CTLA4Ig y una diversidad de vehículos o adyuvantes.

55 El documento WO 97/04801 A describe formulaciones liofilizadas así como su reconstitución para administración subcutánea.

El documento WO 2004/091658 describe formulaciones de anticuerpo y proteínas que se dice que son estables, relativamente isotónicas y de baja turbidez. Las formulaciones descritas comprenden arginina-HCl, histidina y polisorbato.

- 5 Existe la necesidad de formulaciones convenientes eficaces, estables que comprendan moléculas CTLA4Ig para el tratamiento de trastornos del sistema inmunitario.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona formulaciones para tratar enfermedades del sistema inmunitario, administrando a un sujeto moléculas CTLA4Ig, que se unen a moléculas B7 en células positivas para B7, inhibiendo de este modo que las moléculas B7 endógenas se unan a CTLA4 y/o CD28 en linfocitos T.

- 10 La presente invención se refiere a una formulación adecuada para administración subcutánea (SC) que comprende moléculas CTLA4Ig a una concentración proteica de 125 mg/ml en combinación con un azúcar seleccionado de un grupo que consiste en sacarosa, lactosa, maltosa, manitol y trehalosa y mezclas de los mismos, y un vehículo acuoso farmacéuticamente aceptable, en el que la formulación tiene un intervalo de pH de 6 a 8 y una viscosidad de 9 a 20 mPa·s y la relación en peso de azúcar:proteína es 1,1:1 o superior. El azúcar se emplea en una cantidad no mayor que la que puede dar como resultado una viscosidad indeseable o inadecuada para administración mediante jeringa SC. Al azúcar es preferentemente disacáridos, más preferentemente sacarosa. La formulación SC también puede comprender uno o más de los componentes seleccionados de la lista que consiste en agentes tamponantes, tensioactivos y conservantes.

- 20 En ciertas realizaciones, la cantidad de sacarosa útil para estabilización del producto farmacológico SC de molécula CTLA4Ig está en una relación en peso de al menos 1:1,1 de proteína y sacarosa, preferentemente en una relación en peso de 1:1,3 a 1:5 de proteína y sacarosa, más preferentemente en una relación en peso de aproximadamente 1:1,4 de proteína y sacarosa.

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene el producto farmacológico y preferentemente proporciona instrucciones para su uso.

- 25 La presente invención proporciona además procedimientos para tratar enfermedades del sistema inmunitario e inducción a la tolerancia administrando las formulaciones de molécula CTLA4Ig de la invención.

Breve descripción de los dibujos

- 30 La FIGURA 1 presenta la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 1) de una parte de un casete de expresión para una molécula de CTLA4-Ig. También se muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 2) codificada por el ácido nucleico. Las moléculas CTLA4-Ig que pueden producirse a partir de este casete de expresión incluyen moléculas que tienen la secuencia de aminoácidos de los restos: (i) 26-383 de SEC ID N°: 2, (ii) 26-382 de SEC ID N°: 2, (iii) 27-383 de SEC ID N°: 2 o (iv) 26-382 de SEC ID N°: 2 u opcionalmente (v) 25-382 de SEC ID N°: 2, o (vi) 25-383 de SEC ID N°: 2. El casete de expresión comprende las siguientes regiones: (a) una secuencia señal de Oncostatina M (nucleótidos 11-88 de SEC ID N°: 1; aminoácidos 1-26 de SEC ID N°: 2); (b) un dominio extracelular de CTLA4 humano (nucleótidos 89-463 de SEC ID N°: 1; aminoácidos 27-151 de SEC ID N°: 2); (c) una parte modificada de la región constante de IgG1 humana (nucleótidos 464-1159 de SEC ID N°: 1; aminoácidos 152-383 de SEC ID N°: 2), incluyendo una región bisagra modificada (nucleótidos 464-508 de SEC ID N°: 1; aminoácidos 152-166 de SEC ID N°: 2), un dominio CH2 de IgG1 humana modificado (nucleótidos 509-838 de SEC ID N°: 1; aminoácidos 167-276 de SEC ID N°: 2), y un dominio CH3 de IgG1 humana (nucleótidos 839-1159 de SEC ID N°: 1; aminoácidos 277-383 de SEC ID N°: 2).

- 45 La FIGURA 2 representa una secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 3) y aminoácidos (SEC ID N°: 4) de CTLA4-L104EA29Y-Ig (también conocido como "L104EA29YI" y "LEA29Y") que comprende un péptido señal; un dominio extracelular mutado de CTLA4 que comienza en metionina en la posición +1 y termina en ácido aspártico en la posición +124, o que comienza en alanina en la posición -1 y termina en ácido aspártico en la posición +124; y una región Ig. SEC ID N°: 3 y 4 representan una secuencia de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, de L104EA29YIg que comprende un péptido señal; un dominio extracelular mutado de CTLA4 que comienza en metionina en la posición +27 y que termina en ácido aspártico en la posición +150, o que comienza en alanina en la posición +26 y termina en ácido aspártico en la posición +150; y una región Ig. L104EA29YIg puede tener la secuencia de aminoácidos de restos: (i) 26-383 de SEC ID N°: 4, (ii) 26-382 de SEC ID N°: 4, (iii) 27-383 de SEC ID N°: 4 o (iv) 27-382 de SEC ID N°: 4, y opcionalmente (v) 25-382 de SEC ID N°: 4, o (vi) 25-383 de SEC ID N°: 4.

Descripción detallada de la invención

Como se utiliza en el presente documento:

- 55 Una formulación "estable" o producto farmacológico es uno en el que la molécula CTLA4Ig en el mismo esencialmente conserva su estabilidad e integridad física y química tras su almacenamiento. La estabilidad de las formulaciones de molécula CTLA4Ig puede medirse a temperaturas seleccionadas después de periodos de tiempo

seleccionados. Por ejemplo, un aumento de la formación de agregados después de liofilización y almacenamiento es un indicador de inestabilidad de una formulación de molécula CTLA4Ig liofilizada. Además de la formación de agregados, la conservación de la claridad, el color y el olor originales a lo largo del periodo de validez son indicadores utilizados para controlar la estabilidad de las soluciones de molécula CTLA4Ig. Son especies de APM multímeros (es decir tetrámeros, hexámeros, etc.) que tienen un mayor peso molecular que los dímeros de moléculas CTLA4Ig. Típicamente un producto farmacológico “estable” puede ser uno en el que el aumento de la agregación, como se mide por un aumento del porcentaje de especies de alto peso molecular (% de APM), es menor de aproximadamente el 5 % y preferentemente menor de aproximadamente el 3 %, cuando la formulación se almacena a 2-8 °C durante un año. Preferentemente, el producto farmacológico fabricado comprende menos de aproximadamente el 25 % de especies de APM, preferentemente menos de aproximadamente el 15 % de especies de APM, más preferentemente menos de aproximadamente el 10 % de especies de APM, más preferentemente menos de aproximadamente el 5 % de especies de APM.

Las especies monoméricas, diméricas y de APM de molécula CTLA4Ig puede separarse por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). La SEC separa las moléculas basándose en el tamaño molecular. La separación se consigue por la exclusión o inclusión molecular diferencial a medida que las moléculas migran a lo largo de la longitud de la columna. Por lo tanto, la resolución aumenta en función de la longitud de la columna. Las muestras de moléculas CTLA4Ig pueden separarse usando un HPLC 2695 Alliance (Waters, Milford, MA) equipado con columnas TSK Gel® G3000SWXL (300 mm x 7,8 mm) y TSK Gel® G3000SWXL (40 mm x 6,0 mm) (Tosoh Bioscience, Montgomery, PA) en tándem. Se separan muestras a 10 mg/ml (alícuota de 20 µl) usando una fase móvil que consiste en KH₂PO₄ 0,2 M, NaCl 0,9 %, pH 6,8, a un caudal de 1,0 ml/minuto. Las muestras se controlan a una absorbancia de 2820 nm usando detector de Longitud de Onda Doble 2487 de Water. Usando este sistema, la especie de APM tiene un tiempo de retención de 7,5 minutos ± 1,0 minutos. Cada pico se integra con respecto al área bajo el pico. El porcentaje de especies de APM se calcula dividiendo el área de pico de APM por el área de pico total.

Una formulación “reconstituida” es una que se ha preparado disolviendo una formulación liofilizada en un vehículo acuoso de modo que la molécula CTLA4Ig se disuelve en la formulación reconstituida. La formulación reconstituida es adecuada para administración intravenosa (IV) a un paciente que lo necesite.

Una formulación “isotónica” es una que tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas tendrán generalmente una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsmoles/KgH₂O. La expresión “hipertónica” se usa para describir una formulación con una presión osmótica por encima de la de la sangre humana. La isotonicidad puede medirse usando un osmómetro de tipo congelación o presión de vapor, por ejemplo.

La expresión “agente tamponante” se refiere a uno o más componentes que cuando se añaden a una solución acuosa son capaces de proteger la solución contra variaciones en el pH cuando se añade ácido o álcali, o tras la dilución con un disolvente. Además de tampones de fosfato, pueden usarse tampones de glicinato, carbonato, citrato y similares, en cuyo caso, los iones de sodio, potasio o amonio pueden actuar como contraiones.

Un “ácido” es una sustancia que produce iones de hidrógeno en solución acuosa. Un “ácido farmacéuticamente aceptable” incluye ácidos orgánicos e inorgánicos que no son tóxicos a las concentraciones y de la manera en que se formulan.

Una “base” es una sustancia que produce iones hidroxilo en solución acuosa. Las “bases farmacéuticamente aceptables” incluyen bases orgánicas e inorgánicas que no son tóxicas a la concentración y de la manera en que se formulan.

Un “lioprotector” es una molécula que, cuando se combina con una proteína de interés, previene o reduce la inestabilidad química y/o física de la proteína tras liofilización y almacenamiento posterior.

Un “conservante” es un agente que reduce la acción bacteriana y puede añadirse opcionalmente a las formulaciones en el presente documento. La adición de un conservante puede, por ejemplo, facilitar la producción de una formulación de múltiples usos (múltiples dosis). Los ejemplos de conservantes potenciales incluyen cloruro de octadecildimetilbencil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en los que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquil parabenos tales como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3 pentanol y m-cresol.

Un “tensioactivo” es una molécula activa en superficie que contiene tanto una parte hidrófoba (por ejemplo, cadena de alquilo) como una parte hidrófila (por ejemplo, grupos carboxilo y carboxilato). Puede añadirse tensioactivo a las formulaciones de la invención. Los tensioactivos adecuados para su uso en las formulaciones de la presente invención incluyen, pero sin limitación, polisorbatos (por ejemplo polisorbatos 20 y 80); poloxamers (por ejemplo poloxamer 188); ésteres de sorbitán y derivados; Triton; lauril sulfato sódico; octil glicósido sódico; lauril, miristil, linoleil o estearil sulfobetadina; lauril, miristil, linoleil o estearil sarcosina; linoleil, miristil o cetil betaína; lauramidopropil, cocamidopropil, linoleamidopropil, miristamidopropil, palmidopropil o isostearamidopropilbetaína (por

ejemplo, lauroamidopropilo); miristamidopropil, palmidopropil o isostearamidopropil-dimetilamina; metil cocoil taurato sódico o metil oleil taurato disódico; y la serie MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, N. J.), polietilenglicol, polipropilglicol y copolímeros de etileno y propilenglicol (por ejemplo, Pluronic, PF68 etc.).

5 Una "sustancia farmacológica" se refiere al material de partida utilizado en la formulación del producto farmacológico final. La composición de sustancia farmacológica de CTLA4Ig típica comprende una concentración proteica de 20 mg/ml a 60 mg/ml, pH de 7 a 8 y % de especies de APM de < 5 %.

Una "solución a granel formulada" se refiere a la formulación final antes de llenar el recipiente tal como la solución formulada antes de llenar los viales para liofilización, o la solución formulada antes de llenar la jeringa para inyección SC.

10 Un "producto farmacológico" se refiere a la formulación final envasada en un recipiente que pueda reconstituirse antes de su uso, tal como con un producto farmacológico liofilizado; diluido antes de su uso, tal como con un producto farmacológico líquido; o utilizado tal cual, tal como con un producto farmacológico en solución SC.

15 Las expresiones "CTLA4-Ig", "molécula CTLA4-Ig" o "molécula CTLA4Ig" se usan de forma intercambiable, y se refieren a una molécula proteica que comprende al menos un polipéptido que tiene un dominio extracelular CTLA4 o parte del mismo y una región constante de inmunoglobulina o parte de la misma. El dominio extracelular y la región constante de inmunoglobulina puede ser natural, o mutante o modificada, y de mamífero, incluyendo ser humano o ratón. El polipéptido puede comprender además dominios proteicos adicionales. Una molécula de CTLA4-Ig también puede referirse a formas multiméricas del polipéptido, tales como dímeros, tetrámeros y hexámeros. Una molécula de CTLA4-Ig también es capaz de unirse a CD80 y/o CD86.

20 El término "B7-1" se refiere a CD80; el término "B7-2" se refiere a CD86; y el término "B7" se refiere tanto a B7-1 como a B7-2 (CD80 y CD86). El término "B7-1-Ig" o "B7-1Ig" se refiere a CD80-Ig; el término "B7-2-Ig" o "B7-2Ig" se refiere a CD86-Ig.

25 En una realización, "CTLA4Ig" se refiere a una molécula proteica que tiene la secuencia de aminoácidos de los restos: (i) 26-383 de SEC ID N°: 2, (ii) 26-382 de SEC ID N°: 2; (iii) 27-383 de SEC ID N°: 2, o (iv) 27-382 de SEC ID N°: 2, u opcionalmente (v) 25-382 de SEC ID N°: 2, o (vi) 25-383 de SEC ID N°: 2. En forma monomérica estas proteínas pueden denominarse en el presente documento "monómeros de SEC ID N°: 2" o monómeros "que tienen una secuencia SEC ID N°: 2". Estos monómeros de SEC ID N°: 2 pueden dimerizar, de modo que las combinaciones diméricas pueden incluir, por ejemplo: (i) y (i); (i) y (ii); (i) y (iii); (i) y (iv); (i) y (v); (i) y (vi); (ii) y (ii); (ii) y (iii); (ii) y (iv); (ii) y (v); (ii) y (vi); (iii) y (iii); (iii) y (iv); (iii) y (v); (iii) y (vi); (iv) y (iv); (iv) y (v); (iv) y (vi); (v) y (v); (v) y (vi); y (vi) y (vi). Estas diferentes combinaciones diméricas también pueden asociarse entre sí para formar moléculas CTLA4Ig tetraméricas. Estos monómeros, dímeros, tetrámeros y otros multímeros pueden denominarse en el presente documento "proteínas de SEC ID N°: 2" o proteínas "que tienen una secuencia SEC ID N°: 2". (El ADN que codifica CTLA4Ig como se muestra en SEC ID N°: 2 se depositó el 31 de mayo de 1991 en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 según las cláusulas del Tratado de Budapest, y se le ha concedido el número de referencia de ATCC ATCC 68629; una línea celular de Ovario de Hamster Chino (CHO) que expresa CTLA4Ig como se muestra en la SEC ID N°: 2 se depositó el 31 de mayo de 1991 con el número de identificación de ATCC CRL-10762). Como se utiliza en el presente documento "Abatacept" se refiere a proteínas de SEC ID N°: 2.

40 En una realización, CTLA4-L104EA29Y-Ig (en ocasiones conocido como "LEA29Y" o "L104EA29Y") es una proteína de fusión obtenida por ingeniería genética similar en estructura a la molécula CTLA4-Ig como se muestra en SEC ID N°: 1. L104EA29Y-Ig tiene el dominio de unión extracelular funcional de CTLA4 humano modificado y el dominio Fc de inmunoglobulina humana de la clase IgG1. Se realizaron dos modificaciones de aminoácidos, leucina a ácido glutámico en la posición 104 (L104E), que es la posición 130 de SEC ID N°: 2, y alanina a tirosina en la posición 29 (A29Y), que es la posición 55 de SEC ID N°: 2, en la región de unión a B7 del dominio CTLA4 para generar L104EA29Y. Las SEC ID N°: 3 y 4 representan una secuencia de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, de L104EA29YIg que comprenden un péptido señal; un dominio extracelular mutado de CTLA4 que comienza en metionina en la posición +27 y que termina en ácido aspártico en la posición +150, o que comienza en alanina en la posición +26 y que termina en ácido aspártico en la posición +150; y una región Ig. Se depositó ADN que codificaba L104EA29Y-Ig el 20 de junio de 2000, en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) según las cláusulas del Tratado de Budapest. Se le ha concedido el número de referencia de ATCC PTA-2104. L104EA29Y-Ig se describe adicionalmente en la patente de Estados Unidos 7.094.874, expedida el 22 de agosto de 2006 y en el documento WO 01/923337 A2, que se incorporan por referencia en el presente documento en su totalidad.

55 La expresión de L104EA29YIg en células de mamífero puede dar como resultado la producción de variantes de extremo N y C terminal, de modo que las proteínas producidas pueden tener la secuencia de aminoácidos de los restos: (i) 26-383 de SEC ID N°: 4, (ii) 26-382 de SEC ID N°: 4; (iii) 27-383 de SEC ID N°: 4 o (iv) 27-382 de SEC ID N°: 4, u opcionalmente (v) 25-382 de SEC ID N°: 4, o (vi) 25-383 de SEC ID N°: 4. En forma monomérica estas proteínas pueden denominarse en el presente documento "monómeros de SEC ID N°: 4" o monómeros "que tienen una secuencia SEC ID N°: 4". Estas proteínas pueden dimerizar de modo que las combinaciones diméricas pueden incluir, por ejemplo: (i) y (i); (i) y (ii); (i) y (iii); (i) y (iv); (i) y (v); (i) y (vi); (ii) y (ii); (ii) y (iii); (ii) y (iv); (ii) y (v); (ii) y (vi);

(iii) y (iii); (iii) y (iv); (iii) y (v); (iii) y (vi); (iv) y (iv); (iv) y (v); (iv) y (vi); (v) y (v); (v) y (vi); y (vi) y (vi). Estas diferentes combinaciones diméricas también pueden asociarse entre sí para formar moléculas L104EA29Ylg tetraméricas. Estos monómeros, dímeros, tetrámeros y otros multímeros pueden denominarse en el presente documento "proteínas de SEC ID N°: 4" o proteínas "que tienen una secuencia de SEC ID N°: 4". Como se utiliza en el presente documento "Belatacept" se refiere a proteínas de SEC ID N°: 4.

Monómeros y multímeros de CTLA4-Ig

Las moléculas CTLA4-Ig pueden incluir, por ejemplo, proteínas de CTLA4-Ig en formas monomérica, dimérica, trimérica, tetramérica, pentamérica, hexamérica u otras multiméricas. Las moléculas CTLA4-Ig pueden comprender una fusión proteica con al menos un dominio extracelular de CTLA4-Ig y una región constante de inmunoglobulina. Las moléculas CTLA4-Ig pueden tener secuencias naturales o mutantes, por ejemplo, con respecto a las secuencias de dominio extracelular de CTLA4 y región constante de inmunoglobulina. Los monómeros de CTLA4-Ig, solos, o en forma dimérica, tetramérica u otra multimérica, pueden estar glicosilados.

En algunas realizaciones, la invención proporciona poblaciones de moléculas CTLA4-Ig que tienen al menos un cierto porcentaje de moléculas diméricas y otras multiméricas. Por ejemplo, la invención proporciona poblaciones de moléculas CTLA4-Ig que son más del 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 99,5 % de dímeros de CTLA4-Ig. En una realización, la invención proporciona una población de moléculas CTLA4-Ig que comprende de aproximadamente 95 % a aproximadamente 99,5 % de dímero de CTLA4-Ig y de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 5 % de tetrámero de CTLA4-Ig. En otra realización, la población de moléculas CTLA4-Ig comprende aproximadamente 98 % de dímero de CTLA4-Ig, aproximadamente 1,5 % de tetrámero de CTLA4-Ig y aproximadamente 0,5 % de monómero de CTLA4-Ig.

En una realización, la invención proporciona una población de moléculas CTLA4-Ig en la que la población está sustancialmente sin moléculas monoméricas de CTLA4-Ig. Sustancialmente sin moléculas monoméricas de CTLA4-Ig puede referirse a una población de moléculas CTLA4-Ig que tienen menos de 1 %, 0,5 % o 0,1 % de monómeros.

En una realización, la invención proporciona una población de moléculas CTLA4-Ig en la que la población está sustancialmente sin multímeros de CTLA4-Ig que son mayores que los dímeros, tales como tetrámeros, hexámeros, etc. sustancialmente sin moléculas multiméricas de CTLA4-Ig mayores que los dímeros puede referirse a una población de moléculas CTLA4-Ig que tengan menos del 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, o 0,1 % de multímeros de CTLA4-Ig mayores que la forma dimérica.

En una realización, una molécula monomérica de CTLA4-Ig puede tener, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de: (i) 26-383 de SEC ID N°: 2, (ii) 26-382 de SEC ID N°: 2 (iii) 27-383 de SEC ID N°: 2, o (iv) 27-382 de SEC ID N°: 2, u opcionalmente (v) 25-382 de SEC ID N°: 2, o (vi) 25-383 de SEC ID N°: 2. Cuando se expresa un casete de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N°: 1 en células CHO, la forma monomérica predominante expresada tiene el resto de aminoácido N terminal de metionina (resto 27 de SEC ID N°: 2), que corresponde al resto de aminoácido N terminal de CTLA4 humana natural. Sin embargo, debido a que SEC ID N°: 1 también incluye la secuencia codificante para una Secuencia Señal de Oncostatina M (nucleótidos 11-88 de SEC ID N°: 1), la proteína expresada de SEC ID N°: 1 contiene una Secuencia Señal de Oncostatina M. La secuencia señal se escinde de la proteína expresada durante el proceso de exportación proteica del citoplasma, o secreción fuera de la célula. No obstante la escisión puede dar como resultado variantes N terminales, tales como escisión entre los restos de aminoácidos 25 y 26 (dando como resultado un extremo N terminal del resto 26, es decir, la "variante Ala"), o entre los restos de aminoácidos 24 y 25 (dando como resultado un extremo N terminal de resto 2, es decir, la "variante Met-Ala"), a diferencia de la escisión entre los restos de aminoácidos 26 y 27 (dando como resultado un extremo N terminal del resto 27). Por ejemplo, la variante Met-Ala puede estar presente en una mezcla de moléculas CTLA4-Ig a aproximadamente 1 %, y la variante de Ala puede estar presente en una mezcla de moléculas CTLA4-Ig a aproximadamente 8-10 %. Además, la proteína expresada de SEC ID N°: 1 puede tener variantes del extremo C terminal debido a procesamiento incompleto. El extremo C terminal predominante es la glicina en el resto 382 de SEC ID N°: 2. En una mezcla de moléculas CTLA4-Ig, pueden estar presentes monómeros que tengan lisina en el extremo C terminal (resto 383 de SEC ID N°: 2), por ejemplo, a aproximadamente 4-5 %.

Una molécula monomérica de CTLA4-Ig puede comprender un dominio extracelular de CTLA4 humano. En una realización, el dominio extracelular pueden comprender la secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 89-463 de SEC ID N°: 1 que codifica los aminoácidos 27-151 de SEC ID N°: 2. En otra realización, el dominio extracelular puede comprender secuencias mutantes de CTLA4 humano. En otra realización, el dominio extracelular puede comprender cambios de nucleótidos a los nucleótidos 89-463 de SEC ID N°: 1 de modo que se realicen cambios de aminoácidos conservativos. En otra realización, el dominio extracelular puede comprender una secuencia de nucleótidos que sea al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a los nucleótidos 89-463 de SEC ID N°: 1.

Una molécula monomérica de CTLA4-Ig puede comprender una región constante de una inmunoglobulina humana. Esta región constante puede ser una parte de una región constante; esta región constante puede tener una secuencia natural o mutante. La región constante puede ser de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD o IgE humana. La región constante puede ser de una cadena ligera o una cadena pesada de una inmunoglobulina.

- 5 Cuando la región constante es de una molécula de IgG, IgD o IgA, la región constante puede comprender uno o más de los siguientes dominios de región constante: CL, CH1, bisagra, CH2, o CH3. Cuando la región constante es de IgM o IgE, la región constante puede comprender uno o más de los siguientes dominios de región constante: CL, CH1, CH2, CH3, o Ca4. En una realización, la región constante puede comprender uno o más dominios de región constante de IgG, IgD, IgA, IgM o IgE.
- 10 En una realización, una molécula monomérica de CTLA4-Ig comprende una región bisagra de IgG1 humana modificada (nucleótidos 464-508 de SEC ID N°: 1; aminoácidos 152-166 de SEC ID N°: 2) en la que las serinas en los restos de aminoácidos 156, 162 y 165 de SEC ID N°: 2 se han modificado por ingeniería genética a partir de cisteínas presentes en la secuencia natural.
- 15 En una realización, una población de moléculas CTLA4-Ig comprende monómeros que tienen una secuencia mostrada en una cualquiera o más de las Figuras 7, 8 o 9 de la patente de Estados Unidos N° 7.094.874, expedida el 22 de agosto de 2006 y en las solicitudes de patente de Estados Unidos publicadas como Publicación N° US20030083246 y US20040022787.
- 20 En una realización, una molécula tetramérica de CTLA4-Ig comprende dos pares o dos dímeros de polipéptidos de CTLA4-Ig, en los que cada polipéptido tiene una de las siguientes secuencias de aminoácidos: (i) 26-383 de SEC ID N°: 2, (ii) 26-382 de SEC ID N°: 2, (iii) 27-383 de SEC ID N°: 2, o (iv) 27-382 de SEC ID N°: 2, u opcionalmente (v) 25-382 de SEC ID N°: 2, o (vi) 25-383 de SEC ID N°: 2. Cada miembro del par de polipéptidos o dímero está unido covalentemente con el otro miembro, y los dos pares de polipéptidos están asociados de forma no covalente entre sí formando de este modo un tetrámero. Dichas moléculas tetraméricas son capaces de unirse a CD80 o CD86.
- 25 En otra realización, dichas moléculas tetraméricas pueden unirse a CD80 o CD86 con una avidez que es al menos dos veces mayor que la avidez de unión de un dímero de CTLA4-Ig (cuyos monómeros tienen una de las secuencias de aminoácidos anteriores) con CD80 o CD86. En otra realización, dichas moléculas tetraméricas pueden unirse a CD80 o CD86 con una avidez que es al menos dos veces mayor que la afinidad de unión o avidez de CTLA4 natural con CD80 o CD86. Dicha mayor avidez puede contribuir a una mayor eficacia en el tratamiento de trastornos inmunitarios y otras enfermedades como se describen posteriormente. Además, la avidez mayor o mejorada puede producir el resultado de mayor potencia de un fármaco. Por ejemplo, una composición terapéutica que comprenda tetrámero de CTLA4-Ig tendría una mayor avidez y por lo tanto mayor potencia que la misma cantidad de una composición terapéutica que tuviera monómero de CTLA4-Ig. En otra realización, dichas moléculas tetraméricas pueden tener una inhibición al menos dos veces mayor en la proliferación de linfocitos T en comparación con un dímero de CTLA4-Ig (cuyos monómeros tienen una de las secuencias de aminoácidos anteriores). En otra
- 30 realización, dichas moléculas tetraméricas pueden tener al menos una inhibición dos veces mayor en la proliferación de linfocitos T en comparación con una molécula de CTLA4 natural.
- 35 La proliferación de linfocitos T puede medirse usando ensayos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, una de las maneras más habituales de evaluar la proliferación de linfocitos T es estimular linfocitos T mediante antígeno o anticuerpos agonistas para TCR y medir, por ejemplo, la incorporación de timidina tritiada (3H-TdR) en linfocitos T en proliferación o la cantidad de citocinas liberadas por linfocitos T en proliferación al cultivo. El efecto inhibitorio de las moléculas CTLA4-Ig sobre la activación o proliferación de linfocitos T puede por lo tanto medirse.
- 40 La afinidad de una molécula de CTLA4-Ig es la fuerza de unión de la molécula con un único ligando, incluyendo CD80, CD86, o proteínas de fusión CD80lg o CD86lg. La afinidad de CTLA4-Ig con los ligandos puede medirse usando, por ejemplo, análisis de interacción de unión (BIA) basado en técnica de plasmón superficial. Aparte de medir la fuerza de unión, permite determinación en tiempo real de la cinética de unión, tales como las constantes de velocidad de asociación y disociación. Una microplaca sensora, que consiste en un portaobjetos de vidrio revestido con una película metálica fina, a la que se une covalentemente una matriz superficial, está revestida con uno de los interactuantes, es decir, CTLA4-Ig o uno de los ligandos. Se permite que una solución que contenga el otro interactuante fluya sobre su superficie. Se dirige un haz de luz continuo contra el otro lado de la superficie, y se mide su ángulo de reflexión. Tras la unión de CTLA4-Ig con el ligando, el ángulo de resonancia del haz de luz cambia (ya que depende del índice refractivo del medio cerca del lado reactivo del sensor, lo que a su vez se correlaciona directamente con la concentración de material disuelto en el medio). Se analiza posteriormente con la ayuda de un ordenador.
- 45 En una realización, pueden realizarse experimentos de unión de CTLA4-Ig mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIAcore (BIAcore AG, Uppsala, Suecia). CTLA4-Ig puede acoplarse covalentemente por grupos de amina primaria con una matriz de dextrano carboximetilado en una microplaca sensora BIAcore, inmovilizando de este modo CTLA4-Ig en la microplaca sensora. Como alternativa, puede usarse un anticuerpo anti región constante para inmovilizar CTLA4-Ig indirectamente a la superficie sensora mediante el fragmento de Ig. A continuación, se añaden ligandos a la microplaca para medir la unión de CTLA4-Ig con los
- 55

ligandos. Pueden realizarse mediciones de afinidad, por ejemplo, como se describe en van der Merwe, P. y col., J. Exp. Med. (1997) 185 (3): 393- 404.

La avides de las moléculas CTLA4-Ig también puede medirse. La avides puede definirse como la suma total de la fuerza de unión de dos moléculas o células entre sí en múltiples sitios. La avides es distinta de la afinidad que es la fuerza de unión de un sitio en una molécula con su ligando. Sin quedar ligado por la teoría, la mayor avides de las moléculas CTLA4-Ig puede conducir a aumento de la potencia de inhibición por moléculas CTLA4-Ig en la proliferación y activación de linfocitos T. La avides puede medirse, por ejemplo, por dos categorías de ensayos de fase sólida: a) ensayos de inhibición competitiva y b) ensayos de elución. En ambos de ellos el ligando se une a un soporte sólido. En el ensayo de inhibición competitiva, se añaden después moléculas CTLA4-Ig en solución a una concentración fija, junto con ligando libre en diferentes concentraciones, y se determina la cantidad de ligando que inhibe la unión de fase sólida en 50 %. Cuanto menos ligando se necesite, más fuerte será la avides. En ensayos de elución, el ligando se añade en solución. Después de obtener un estado de equilibrio, se añade un caótropro o agente desnaturante (por ejemplo, isotiocianato, urea o dietilamina) en diferentes concentraciones para alterar las interacciones de CTLA4-Ig/ligando. La cantidad de elución que resiste CTLA4-Ig se determina a continuación con un ELISA. Cuanto mayor sea la avides, más agente caótrópico se necesitará para eluir una cierta cantidad de CTLA4-Ig. La avides relativa de una mezcla heterogénea de moléculas CTLA4-Ig puede expresarse como el índice de avides (IA), igual a la concentración de agente de elución necesario para eluir el 50 % de las moléculas CTLA4-Ig unidas. Puede realizarse análisis refinado de los datos determinando los porcentajes de CTLA4-Ig eluido a diferentes concentraciones del agente de elución.

20 Procedimientos para producir las moléculas CTLA4Ig

La expresión de moléculas CTLA4Ig puede ser en células procariotas. Las procariotas más frecuentemente se representan por diversas cepas de bacterias. Las bacterias pueden ser gram positivas o gram negativas. Típicamente, se prefieren bacterias gram negativas tales como *E. coli*. También pueden usarse otras cepas microbianas.

Pueden insertarse secuencias, descritas anteriormente, que codifican moléculas CTLA4-Ig en un vector diseñado para expresar secuencias ajenas en células procariotas tales como *E. coli*. Estos vectores pueden incluir secuencias de control procariota usadas habitualmente que se define en el presente documento que incluyen promotores para inicio de la transcripción, opcionalmente con un operador, junto con secuencias de sitio de unión a ribosomas, incluyendo promotores usados habitualmente como los sistemas promotores de beta lactamasa (penicilinas) y lactosa (*lac*) (Chang, y col., (1977) Nature 198: 1056), el sistema promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel, y col., (1980) Nucleic Acids Res. 8: 4057) y el promotor P_L derivado de lambda y sitio de unión a ribosoma del gen N (Shimatake, y col., (1981) Nature 292: 128).

Dichos vectores de expresión también incluirán orígenes de replicación y marcadores seleccionables, tales como un gen de beta lactamasa o neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia a antibióticos, de modo que los vectores pueden replicarse en bacterias y pueden seleccionarse células que portan los plásmidos para cuando se cultiven en presencia de antibióticos, tales como ampicilina o kanamicina.

El plásmido de expresión puede introducirse en células procariotas mediante una diversidad de procedimientos convencionales, incluyendo pero sin limitación choque de CaCl₂ (Cohen, (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110, y Sambrook y col. (eds.), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª Edición, Cold Spring Harbor Press, (1989)) y electroporación.

Las células eucariotas también son células hospedadoras adecuadas. Los ejemplos de células eucariotas incluyen cualquier célula animal, bien primaria o bien inmortalizada, células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Pichia pastoris*) y vegetales. Las células de mieloma, COS y CHO son ejemplos de células animales que pueden usarse como hospedadores. Las células CHO particulares incluyen, pero sin limitación, DG44 (Chasin, y col., 1986 Som. Cell. Molec. Genet 12: 555-556; Kolkekar 1997 Biochemistry 36: 10901-10909), CHO-K1 (ATCC N° CCL-61), línea celular CHO-K1 Tet-On (Clontech), CHO designada ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), clon de CHO 13 (GEIMG, Génova, IT), clon de CHO B (GEIMG, Génova, IT), CHO-K1/SF designada ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido) y RR-CHOK1 designada ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido). Las células vegetales ilustrativas incluyen células de tabaco (plantas completas, cultivo celular o callo), maíz, soja y arroz. También son aceptables semillas de maíz, soja y arroz.

También pueden insertarse secuencias de ácido nucleico que codifican moléculas CTLA4Ig descritas anteriormente en un vector diseñado para expresar secuencias ajenas en un hospedador eucariota. Los elementos reguladores del vector pueden variar de acuerdo con el hospedador eucariota particular.

Las secuencias de control eucariotas usadas habitualmente para uso en vectores de expresión incluyen promotores y secuencias de control compatibles con células de mamífero tales como, por ejemplo, promotor de CMV (promotor CDM8) y virus de sarcoma aviar (ASV) (vector π LN). Otros promotores habitualmente usados incluyen los promotores temprano y tardío de Virus de Simio 40 (SV40) (Fiers, y col., (1973) Nature 273: 113), u otros promotores

virales tales como los derivados de poliovirus, Adenovirus 2 y virus del papiloma bovino. También puede usarse un promotor inducible, tal como hMTII (Karin, y col., (1982) Nature 299: 797-802).

5 Los vectores para expresar moléculas CTLA4Ig en eucariotas también pueden portar secuencias llamadas regiones potenciadoras. Estas son importantes en la optimización de la expresión génica y se encuentran bien cadena arriba o bien cadena abajo de la región promotora.

10 Los ejemplos de vectores de expresión para células hospedadoras eucariotas incluyen, pero sin limitación, vectores para células hospedadoras de mamífero (por ejemplo, BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); Vectores pVPakc, vectores pCMV, vectores pSG5 (Stratagene)), vectores retrovirales (por ejemplo, vectores pFB (Stratagene)), pCDNA-3 (Invitrogen) o formas modificadas de los mismos, vectores adenovirales; vectores de virus adenoasociados, vectores de baculovirus, vectores de levadura (por ejemplo, vectores pESC (Stratagene)).

Las secuencias de ácido nucleico que codifican moléculas CTLA4Ig pueden integrarse en el genoma de la célula hospedadora eucariota y replicar como los replicados del genoma hospedador. Como alternativa, el vector que porta moléculas CTLA4Ig puede contener orígenes de replicación que permitan la replicación extracromosómica.

15 Para expresar las secuencias de ácido nucleico en *Saccharomyces cerevisiae*, puede usarse el origen de replicación del plásmido de levadura endógeno, el círculo 2 μ . (Broach, (1983) Meth. Enz. 101: 307). Como alternativa, pueden usarse secuencias del genoma de levadura capaces de promover la replicación autónoma (véase, por ejemplo, Stinchcomb y col., (1979) Nature 282: 39); Tschemper y col., (1980) Gene 10: 157; y Clarke y col., (1983) Meth. Enz. 101: 300).

20 Las secuencias de control de la transcripción para vectores de levadura incluyen promotores para la síntesis de enzimas glicolíticas (Hess y col., (1968) J. Adv. Enzyme Reg. 7: 149; Holland y col., (1978) Biochemistry 17: 4900). Los promotores adicionales conocidos en la técnica incluyen el promotor de CMV proporcionado en el vector CDM8 (Toyama y Okayama, (1990) FEBS 268: 217-221); el promotor para 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman y col., (1980) J. Biol. Chem. 255: 2073), y los de otras enzimas glicolíticas.

25 Otros promotores son inducibles porque pueden regularse por estímulos ambientales o el medio de cultivo de las células. Estos promotores inducibles incluyen los de los genes para proteínas de choque térmico, alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas asociadas con catabolismo del nitrógeno y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

30 También pueden colocarse secuencias reguladoras en el extremo 3' de las secuencias codificantes. Estas secuencias pueden actuar para estabilizar el ARN mensajero. Dichos terminadores se encuentran en la región 3' no traducida después de las secuencias codificantes en varios genes de mamífero y derivados de levadura.

Los vectores ilustrativos para plantas y células vegetales incluyen, pero sin limitación, plásmidos T_i de *Agrobacterium*, virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y virus del mosaico dorado del tomate (TGMV).

35 Las células de mamífero pueden transformarse por procedimientos que incluyen pero sin limitación, transfección en presencia de fosfato cálcico, microinyección, electroporación o mediante transducción con vectores virales.

40 Los procedimientos para introducir secuencias de ADN ajenas en genomas de planta y levadura incluyen (1) procedimientos mecánicos, tales como microinyección de ADN en células individuales o protoplastos, agitar vorticialmente células con perlas de vidrio en presencia de ADN o disparar esferas de tungsteno u oro revestidas de ADN en células o protoplastos; (2) introducir ADN haciendo a las membranas celulares permeables a macromoléculas mediante tratamiento con polietilenglicol o aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje (electroporación); o (3) el uso de liposomas (que contienen ADNc) que se fusionan con membranas celulares.

45 La solicitud de patente de Estados Unidos Número de Publicación US 20050019859 y la solicitud de patente de Estados Unidos Número de Publicación de Estados Unidos 20050084933 enseñan procedimientos para la producción de proteínas usados para las formulaciones de la presente invención, específicamente productos glicoproteicos recombinantes, mediante cultivos de células animales o de mamífero.

Después de la fase de producción de proteínas del procedimiento de cultivo celular, se recuperan moléculas de CTLA4Ig del medio de cultivo celular usando técnicas conocidas por un experto en la materia. En particular, la molécula CTLA4Ig se recupera del medio de cultivo como un polipéptido secretado.

50 El medio de cultivo se centrifuga inicialmente para retirar residuos celulares y partículas. La proteína deseada posteriormente se purifica de ADN contaminante, proteínas solubles y polipéptidos, con los siguientes procedimientos de purificación no limitantes bien establecidos en la técnica: SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; precipitación con etanol; fraccionamiento en columnas de inmutioafinidad o intercambio iónico; HPLC de fase inversa; cromatografía en sílice o en una resina de intercambio aniónico tal como QAE o DEAE; cromatoenfoco; filtración en gel usando, por ejemplo, columna de Sephadex G-75TM; y columnas de proteína A SepharoseTM para retirar contaminantes tales como IgG. La adición de un inhibidor de proteasa, tal como fenil metil

55

sulfonil fluoruro (PMSF), o una mezcla de cóctel inhibidor de proteasa también puede ser útil para inhibir la degradación proteolítica durante la purificación. Un experto en la materia reconocerá que los procedimientos de purificación adecuados para una proteína de interés, por ejemplo una glicoproteína, pueden requerir alteraciones para adaptarse a cambios en el carácter de la proteína tras su expresión en cultivo celular recombinante.

5 También son útiles dentro del contexto de la presente invención técnicas y procedimientos de purificación que seleccionen los grupos carbohidrato de la glicoproteína. Por ejemplo, dichas técnicas incluyen HPLC o cromatografía de intercambio iónico usando resinas de intercambio catiónico o aniónico, en las que se recoge la fracción más básica o más ácida, dependiendo de qué carbohidrato se seleccione. El uso de dichas técnicas también puede dar como resultado la retirada conjunta de contaminantes.

10 El procedimiento de purificación puede comprender además etapas adicionales que inactiven y/o retiren virus y/o retrovirus que podrían potencialmente estar presentes en el medio de cultivo celular de líneas celulares de mamífero. Está disponible un número significativo de etapas de eliminación viral, incluyendo pero sin limitación, tratar con caótipos tales como urea o guanidina, detergentes, etapas de ultrafiltración/diafiltración adicionales, separación convencional, tales como cromatografía de exclusión por tamaño o de intercambio iónico, extremos de pH, calor, proteasas, disolventes orgánicos o cualquier combinación de los mismos.

La molécula CTLA4Ig purificada requiere concentración y un intercambio de tampón antes de su almacenamiento o procesamiento adicional. Puede usarse un sistema Pall Filtron TFF para concentrar e intercambiar el tampón de elución de la columna de purificación previa con el tampón final deseado para la sustancia farmacológica.

20 En un aspecto, las moléculas CTLA4Ig purificadas, que se han concentrado y sometido a etapa de diafiltración, pueden cargarse en frascos Biotainer[®] de 2 l, bolsa de bioprocedimiento de 50 l o cualquier otro recipiente adecuado. Las moléculas CTLA4Ig en dichos recipientes pueden almacenarse durante aproximadamente 60 días de 2 °C a 8 °C antes de su congelación. El almacenamiento prolongado de moléculas CTLA4Ig de 2 °C a 8 °C puede conducir a un aumento de la proporción de especies de APM. Por lo tanto, para el almacenamiento a largo plazo, las moléculas CTLA4Ig pueden congelarse a aproximadamente -70 °C antes de su almacenamiento y almacenarse a una temperatura de aproximadamente -40 °C. La temperatura de congelación puede variar de aproximadamente -50 °C a aproximadamente -90 °C. El tiempo de congelación puede variar y depende en gran medida del volumen del recipiente que contenga las moléculas CTLA4Ig, y el número de recipientes que se cargan en el congelador. Por ejemplo, en una realización, las moléculas CTLA4Ig están en frascos Biotainer[®] de 2 l. La carga de menos de cuatro frascos Biotainer[®] de 2 l en el congelador puede requerir de aproximadamente 14 a al menos 18 horas de tiempo de congelación. La carga de menos de cuatro frascos puede requerir de aproximadamente 18 a aproximadamente 24 horas de tiempo de congelación. Los recipientes con moléculas CTLA4Ig congeladas se almacenan a una temperatura de aproximadamente -35 °C a aproximadamente -55 °C. El tiempo de almacenamiento a una temperatura de aproximadamente unos -35 °C a aproximadamente -55 °C puede variar y puede ser tan corto como 18 horas. La sustancia farmacológica congelada puede descongelarse de una manera controlada para la formulación de producto farmacológico.

40 La solicitud de patente de Estados Unidos N^o de Serie: 60/752.267, en tramitación, presenta el 20 de diciembre de 2005 y 06/849.543, presentada el 5 de octubre de 2006 y la solicitud de patente de PCT N^o de Expediente del Mandatario 10734 PCT titulada Cell Lines, Compositions and Methods for Producing a Composition con el inventor Kirk Leister presentada el 19 de diciembre de 2006 enseñan procedimientos para la producción de proteínas usadas para formulaciones usadas para formulaciones de la presente invención, específicamente productos glicoproteicos recombinantes, mediante cultivos celulares de mamífero o animales.

Formulación subcutánea líquida

45 Un experto en la materia reconocería la inconveniencia de una formulación IV para los pacientes que necesitan terapia frecuente, crónica. El paciente tiene que realizar frecuentes viajes al hospital para recibir su fármaco mediante una infusión IV que puede durar hasta una hora. En consecuencia, sería beneficiosa para dicho paciente una formulación SC que pudiera autoadministrarse en casa.

50 Para administración subcutánea, se desea una forma farmacéutica con altas concentraciones de proteínas. Los tratamientos con altas dosis de más de 1 mg/kg (>100 mg por dosis) requieren desarrollo de formulaciones a concentraciones que excedan 100 mg/ml debido al pequeño volumen (<1,5 ml) que puede proporcionarse por las vías SC. Para optimizar la estabilidad a largo plazo a alta concentración contra la formación de especies de alto peso molecular, se realizaron estudios de desarrollo de formulación para evaluar el efecto de diversos excipientes en la estabilidad de estado de solución de las formulaciones SC líquidas de la invención.

55 La formulación SC de la invención comprende la molécula CTLA4Ig a una concentración de proteínas de 125 mg/ml en combinación con un azúcar a niveles estabilizadores, y un vehículo acuoso farmacéuticamente aceptable, el azúcar está en una relación en peso de al menos 1:1,1 de proteína y azúcar (es decir azúcar:proteína 1,1:1 o mayor). El estabilizador se emplea en una cantidad no mayor que la que puede dar como resultado una viscosidad no deseable o inadecuada para la administración mediante jeringa SC. El azúcar es preferentemente disacáridos, más preferentemente sacarosa. La formulación SC también puede comprender uno o más de los componentes

seleccionados de la lista que consiste en agentes tamponantes, tensioactivos y conservantes.

El perfil de estabilidad de la formulación SC se evaluó en presencia de diversos estabilizadores incluyendo azúcares, polisacáridos, aminoácidos, tensioactivos, polímeros, ciclodextranos, proteínas, etc. Entre todos los excipientes evaluados, azúcares tales como sacarosa, manitol y trehalosa tuvieron un mejor efecto estabilizador contra la formación de especies de alto peso molecular.

Los ejemplos V y VIII describen estudios de estabilidad de producto farmacológico Belatacept y Abatacept SC, respectivamente, en presencia de sacarosa almacenada a diversas temperaturas durante diversos periodos de tiempo. Un aumento de las especies de alto peso molecular se controló usando un ensayo de cromatografía de exclusión por tamaño indicador de estabilidad (SE-HPLC). Los resultados demuestran que la estabilidad de la molécula CTLA4Ig en la formulación SC se potencia en presencia de sacarosa. La estabilización por sacarosa fue mejor a una relación en peso de sacarosa:proteína mayor. Basándose en estos estudios, la sacarosa se seleccionó como el estabilizador a una relación que proporcionara estabilidad óptima sin dar como resultado una solución SC con excesiva hipertonidad.

La cantidad de sacarosa útil para estabilización del producto farmacológico SC está en una relación en peso de al menos 1:1,1 de proteína y sacarosa, preferentemente en una relación en peso de 1:1,3 a 1:5 de proteína y sacarosa, más preferentemente en una relación en peso de aproximadamente 1:1,4 de proteína y sacarosa.

Si es necesario, el pH de la formulación se ajusta mediante la adición de un ácido y/o base farmacéuticamente aceptable. El ácido farmacéuticamente aceptable preferido es ácido clorhídrico. La base preferida es hidróxido sódico.

Durante el desarrollo de la formulación, la estabilidad del producto farmacológico de SC se estudió en función del pH. El ejemplo V describe estudios de estabilidad con producto farmacológico Belatacept SC en función del pH. El pH de la formulación SC se ajustó entre 7 y 8,2, las muestras se estabilizaron y el producto farmacológico se controló con respecto a un aumento de las especies de alto peso molecular en diversos puntos temporales usando un ensayo de cromatografía de exclusión por tamaño indicador de estabilidad (SE-HPLC). En las condiciones de almacenamiento recomendadas de 2^o-8^o °C, no se observaron cambios significativos en la velocidad de formación de especies de APM después de 3 meses.

Además de la agregación, la desamidación es una variante de producto habitual de los péptidos y proteínas que puede aparecer durante la fermentación, clarificación de células/recogida, purificación, almacenamiento de sustancia farmacológica/producto farmacológico y durante el análisis de las muestras. La desamidación es la pérdida de NH₃ de una proteína que forma un intermedio de succinimida que puede experimentar hidrólisis. El intermedio de succinimida da como resultado una reducción de la masa de 17 u del péptido parental. La hidrólisis posterior da como resultado un aumento de la masa de 18 u. El aislamiento del intermedio de succinimida es difícil debido a la inestabilidad en condiciones acuosas. Como tal, la desamidación es típicamente detectable como aumento de masa de 1 u. La desamidación de una asparagina da como resultado ácido aspártico o isoaspártico. Los parámetros que afectan a la velocidad de desamidación incluyen pH, temperatura, constante dieléctrica de disolvente, fuerza iónica, secuencia primaria, conformación polipeptídica local y estructura terciaria. Los restos de aminoácidos adyacentes a Asn en la cadena peptídica afectan a las velocidades de desamidación. Gly y Ser después de una Asn en secuencias proteicas da como resultado una mayor susceptibilidad a desamidación.

Los estudios de estabilidad a escala de laboratorio preliminares sugieren que la desamidación superará los niveles de referencia del procedimiento de ensayo de mapeo peptídico a los 24 meses usando la formulación de abatacept a pH 7,8. Los datos a los seis meses tanto a 2-8 °C como a 25 °C a 60 % de humedad mostraron que la velocidad de desamidación era menor a pH 7,2 y mayor a pH 8 en comparación con la muestra de abatacept SC a pH 7,8. Los ejemplos IX y XII describen estudios de pH a escala de laboratorio diseñados para evaluar la desamidación en las formulaciones de producto farmacológico SC en el intervalo de pH de 6,3 a 7,2.

El intervalo de pH aceptable para el producto farmacológico SC es de 6 a 8, preferentemente de 6 a 7,8, más preferentemente de 6 a 7,2.

En otro aspecto, las sales o componentes de tampón puede añadirse en una cantidad de al menos 10 mM, preferentemente 10-200 mM. Las sales y/o tampones son farmacéuticamente aceptables y derivan de diversos ácidos conocidos (inorgánicos y orgánicos) con metales o aminas "formadores de base". Además de tampones de fosfato, se pueden usar tampones de glicinato, carbonato, citrato y similares, en cuyo caso los iones de sodio, potasio o amonio pueden actuar como contraión.

El ejemplo VIII describe el efecto de la concentración del tampón en el producto farmacológico de Abatacept SC. La estabilidad fue mejor en tampón fosfato 10 mM en comparación con tampón fosfato 5 mM a pH 7,5 a una concentración de producto farmacológico de abatacept 100 mg/ml. Además la capacidad de tamponamiento superior del tampón fosfato 10 mM ofreció el mejor control de pH de la formulación en comparación con tampón 5 mM.

El vehículo acuoso de interés en el presente documento es uno que es farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para administración a un ser humano) y es útil para la preparación de una formulación líquida. Los vehículos

ilustrativos incluyen agua estéril para inyección (SWFI), agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución con pH tamponado (por ejemplo solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

5 Puede añadirse opcionalmente un conservante a las formulaciones en el presente documento para reducir la acción bacteriana. La adición de un conservante puede, por ejemplo, facilitar la producción de una formulación multiusos (dosis múltiple).

10 Como se analiza con el producto farmacológico liofilizado, la molécula CTLA4Ig es incompatible con la silicona encontrada en jeringas convencionales, porque interacciona con la silicona para formar partículas visibles, limitando de este modo al paciente a utilizar jeringas sin silicona. La formulación SC puede comprender opcionalmente un tensioactivo para evitar la formación de partículas visibles en presencia de silicona.

15 Los ejemplos V y VIII describen el efecto de tensioactivos tales como Polisorbato 80 y Poloxamer 188 en la estabilidad en solución de producto farmacológico de belatacept y abatacept, respectivamente, y se descubrió que los tensioactivos no tenían efecto sobre la estabilidad de la molécula CTLA4Ig en una formulación SC. Se evaluaron diferentes niveles de Poloxamer 188 y se descubrió que la concentración de 4 mg/ml a 8 mg/ml, preferentemente 8 mg/ml era adecuada, para evitar la formación de partículas relacionada con silicona en la formulación.

Una composición típica de producto farmacológico de belatacept SC, producto farmacológico 125 mg/ml (100 mg/vial) se proporciona en la Tabla 3 dada a continuación.

TABLA 3

Composición de producto farmacológico de Belatacept SC, 125 mg/ml (100 mg/vial)	
Componente	Cantidad (mg/vial) ^b
Belatacept	140,0
Sacarosa	190,4
Poloxamer 188	8,96
Fosfato sódico monobásico, monohidrato	0,371
Fosfato sódico dibásico, anhídrido	1,193
Agua para Inyección	c.s. hasta 1,12 ml
^d Incluye 40 % de rebase para carga de Vial, Aguja, Jeringa	

20 Se proporciona una composición típica de producto farmacológico de abatacept SC, 125 mg/ml (125 mg/vial) en la Tabla 4 dada a continuación.

TABLA 4

Composición de producto farmacológico de Abatacept SC, 125 mg/ml (125 mg/vial)	
Componente	Cantidad (mg/vial) ^c
Abatacept	175
Sacarosa	238
Poloxamer 188	11,2
Fosfato sódico monobásico, monohidrato	0,20
Fosfato sódico dibásico, anhídrido	1,36
Agua para Inyección	c.s. hasta 1,4 ml
^d Incluye 40 % de rebase para pérdida de Vial, Aguja, Jeringa	

Se proporciona una composición típica de producto farmacológico de abatacept SC, 125 mg/ml cargado en una jeringa en la Tabla 5 dada a continuación.

TABLA 5

Composición de producto farmacológico de Abatacept SC, 125 mg/ml (125 mg/jeringa)	
Componente	Cantidad (mg/jeringa)
Abatacept	125
Sacarosa	170
Poloxamer 188	8,0
Fosfato sódico monobásico, monohidrato	0,143
Fosfato sódico dibásico, anhídrido	0,971
Agua para Inyección	c.s. hasta 1 ml

La condición de almacenamiento recomendada para la formulación SC es de 2-8 °C con un periodo de caducidad recomendado de al menos 12 meses.

5 La densidad del producto farmacológico de abatacept SC y el placebo correspondiente se determinó a temperatura ambiente usando el densitómetro Mettler-Toledo. Las mediciones se realizaron usando muestras de 5 ml por triplicado. Se descubrió que la densidad de la formulación de abatacept SC era de 1,1 g/cm³ y se descubrió que la del producto de placebo era de 1,065 g/cm³. Típicamente, la densidad de una formulación de CTLA4Ig SC es de aproximadamente 1,0 g/cm³ a aproximadamente 1,2 g/cm³, preferentemente de aproximadamente 1,0 g/cm³ a aproximadamente 1,15 g/cm³, más preferentemente de aproximadamente 1,095 g/cm³ a aproximadamente 1,105 g/cm³.

10 La viscosidad de la formulación de abatacept SC se determinó usando el reómetro Brookfield a temperatura ambiente. Se usó un patrón de referencia de 9,3 mPa·s (cps) para las mediciones. Se descubrió que la viscosidad del producto farmacológico SC a la concentración de abatacept 125 mg/ml era de 13 ± 2 mPa·s (cps). Típicamente, la viscosidad de una formulación de CTLA4Ig SC a 125 mg/ml es de aproximadamente 9 a aproximadamente 20 mPa·s (cps), preferentemente de aproximadamente 9 a aproximadamente 15 mPa·s (cps), más preferentemente de 12 a aproximadamente 15 mPa·s (cps).

15 La osmolalidad de producto farmacológico de abatacept SC y formulación de placebo se midió usando un procedimiento de presión de vapor. Los datos muestran que a concentraciones de 125 mg/ml, la osmolalidad de la formulación de abatacept SC es de 770 ± 25 mOsm/kg de H₂O. Típicamente, la osmolalidad de una formulación de CTLA4Ig SC a 125 mg/ml es de aproximadamente 250 a aproximadamente 800 mOsm/kg de H₂O, preferentemente de aproximadamente 700 a aproximadamente 800 mOsm/kg de H₂O, más preferentemente de aproximadamente 750 a aproximadamente 800 mOsm/kg de H₂O.

Preparación de la formulación SC

25 El procedimiento de fabricación desarrollado para formulaciones SC típicamente implica formar compuestos con azúcar y tensioactivo, seguido de filtración estéril aséptica y llenado de viales o jeringas, opcionalmente precedido de diafiltración (intercambio de tampones) y concentración de sustancia farmacológica usando una unidad de ultrafiltración.

Los ejemplos I y II describen la preparación de los productos farmacológicos de Belatacept y Abatacept SC, respectivamente.

30 Un experto en la materia será consciente de la necesidad de rebasar el recipiente para compensar la retención en vial, aguja y jeringa durante la preparación e inyección. Por ejemplo, se incorpora una media del 40 % de producto farmacológico en cada recipiente de formulación líquida SC para compensar las pérdidas de retirada y garantizar que se retiren 0,8 ml de la solución que contengan 100 mg del producto farmacológico de belatacept del recipiente.

Artículos de fabricación

35 En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene el producto farmacológico y preferentemente proporciona instrucciones para su uso. El artículo de fabricación comprende un recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas y tubos de ensayo. El recipiente puede formarse de una diversidad de materiales tales como vidrio, plástico o metales.

40 El recipiente mantiene la formulación de la presente invención. La etiqueta en, o asociada con, el recipiente puede indicar instrucciones para reconstitución y/o uso. Por ejemplo, la etiqueta puede indicar que la formulación SC es útil o se pretende para administración subcutánea. El recipiente que contiene la formulación puede ser un vial multiusos,

que permita administraciones repetidas (por ejemplo de 2 a 6 administraciones) de, por ejemplo, la formulación subcutánea. Como alternativa, el recipiente puede ser una jeringa precargada que contiene la formulación subcutánea.

5 El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vistas comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para su uso.

Se utilizan preferentemente jeringas sin silicona para producto farmacológico sin tensioactivo.

Procedimientos de uso

10 La presente invención proporciona además procedimientos para tratar enfermedades del sistema inmunitario o inducción de tolerancia que comprenden administrar una cantidad eficaz de las formulaciones de molécula CTLA4Ig de la invención. En realizaciones particulares, las enfermedades del sistema inmunitario están mediadas por interacciones de células positivas para CD28 y/o CTLA4 con células positivas para CD80/CD86. En una realización adicional, se inhiben las interacciones de linfocitos T. Las enfermedades del sistema inmunitario, incluyen, pero sin limitación, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inmunoproliferativas y trastornos relacionados con injertos. Estos procedimientos comprenden administrar a un sujeto las formulaciones de moléculas CTLA4Ig de la invención para regular las interacciones de linfocitos T con las células positivas para CD80 y/o CD86. Los ejemplos de enfermedades relacionadas con injertos incluyen enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) (por ejemplo, tal como pueden resultar de trasplante de médula ósea o en la inducción de tolerancia), trastornos inmunitarios asociados con el rechazo de trasplantes de injertos, rechazo crónico y aloinjertos o xenoinjertos tisulares o celulares, incluyendo órganos sólidos, piel, islotes, músculos, hepatocitos, neuronas. Los ejemplos de enfermedades inmunoproliferativas incluyen, pero sin limitación, psoriasis; linfoma de linfocitos T; leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T; linfoma de linfocitos T angiocéntrico testicular, angeítis linfocítica benigna; y enfermedades autoinmunitarias tales como lupus (por ejemplo, lupus eritematoso, nefritis lúpica), tiroiditis de Hashimoto, mixedema primario, enfermedad de Graves, anemia perniciosa, gastritis atrófica autoinmunitaria, enfermedad de Addison, diabetes (por ejemplo diabetes mellitus insulino dependiente, diabetes mellitus de tipo I), síndrome de good pasture, miastenia grave, pénfigo, enfermedad de Crohn, oftalmia simpática, uveítis autoinmunitaria, esclerosis múltiple, anemia hemolítica autoinmunitaria, trombocitopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis de acción crónica, colitis ulcerosa, síndrome de Sjogren, enfermedades reumáticas (por ejemplo, artritis reumatoide), polimiositis, esclerodermia y enfermedad del tejido conectiva mixta.

30 La presente invención proporciona además un procedimiento para inhibir rechazos de trasplante de órganos y/o tejidos sólidos por un sujeto, siendo el sujeto un receptor de tejido de trasplante. Típicamente, en trasplantes de tejido, el rechazo del injerto se inicia mediante su reconocimiento como ajeno por linfocitos T, seguido de una respuesta inmunitaria que destruye el injerto. Las formulaciones de molécula CTLA4Ig de la presente invención, inhibiendo las proliferación de linfocitos T y/o secreción de citocinas, puede dar como resultado la reducción de la destrucción tisular y la inducción de insensibilidad de linfocitos T específica de antígeno puede dar como resultado aceptación de injerto a largo plazo sin la necesidad de inmunosupresión generalizada. Además, las formulaciones de moléculas CTLA4Ig de la invención pueden administrarse con otros productos farmacéuticos incluyendo, pero sin limitación, cortico esteroides, ciclosporina, rapamicina, mofetil micofenolato, azatioprina, Tacrolimus, basiliximab y/u otros productos biológicos.

40 La presente invención también proporciona procedimientos para inhibir la enfermedad de injerto contra huésped en un sujeto. Este procedimiento comprende administrar al sujeto las formulaciones de la invención, solas o juntas, con más ligandos adicionales, reactivas con IL-2, IL-4 o interferón γ . Por ejemplo, una formulación de molécula CTLA4Ig SC de la presente invención puede administrarse a un receptor de trasplante de médula ósea para inhibir la alorreactividad de linfocitos T donadores. Como alternativa, los linfocitos T donadores dentro de un injerto de médula ósea pueden hacerse tolerantes a los aloantígenos de un receptor *ex vivo* antes del trasplante.

45 La inhibición de respuestas de linfocitos T por formulaciones de moléculas CTLA4Ig de la invención también puede ser útil para tratar trastornos autoinmunitarios. Muchos trastornos autoinmunitarios resultan de la activación inapropiada de linfocitos T que son sensibles frente a autoantígenos, y que promueven la producción de citocinas y autoanticuerpos que están implicados en la patología de la enfermedad. La administración de una formulación de moléculas CTLA4Ig en un sujeto que padece o es susceptible a un trastorno autoinmunitario puede evitar la activación de linfocitos T autorreactivos y puede reducir o eliminar los síntomas de la enfermedad. Este procedimiento también puede comprender administrar al sujeto una formulación de la invención, sola o junto con más ligandos adicionales, reactivos con IL-2, IL-4 o interferón γ .

55 El modo de administración y el régimen de dosificación más eficaces para las formulaciones de la presente invención dependen de la gravedad y el desarrollo de la enfermedad, la salud del paciente y la respuesta a tratamiento y el criterio del médico tratante. De acuerdo con la práctica de la invención una cantidad eficaz para tratar a un sujeto puede estar entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del sujeto. Además, la cantidad eficaz puede ser una cantidad entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del sujeto.

Las formulación de moléculas CTLA4Ig de la invención pueden administrarse a un sujeto en una cantidad y durante un tiempo (por ejemplo longitud de tiempo y/o múltiples momentos) suficientes para bloquear la unión de las moléculas B7 endógenas (por ejemplo, CD80 y/o CD86) con sus respectivos ligandos en el sujeto. El bloqueo de la unión de B7 endógena/ligando inhibe de este modo las interacciones entre células positivas para B7 (por ejemplo células positivas para CD80 y/o CD86) con células positivas para CD28 y/o CTLA4. La dosificación de la molécula CTLA4Ig depende de muchos factores incluyendo, pero sin limitación, el tipo de tejido afectados, el tipo de enfermedad que se trate, la gravedad de la enfermedad, la salud de un sujeto, y la respuesta de un sujeto al tratamiento con los agentes. En consecuencia, las dosificaciones de los agentes puede variar dependiendo del sujeto y el modo de administración, solicitud de patente de Estados Unidos Número de Publicación de Estados Unidos US 2003/0083246 y solicitud de patente de Estados Unidos Número de Publicación de Estados Unidos 2004/0022787 enseñan los programas de dosificación y administración para CTLA4Ig que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 2 para tratar enfermedades reumáticas, tales como artritis reumatoide.

Puede administrarse una cantidad eficaz de molécula CTLA4Ig a un sujeto diariamente, semanalmente, mensualmente y/o anualmente, en una única o múltiples veces por hora/día/semana/mes/año, dependiendo de la necesidad. Por ejemplo, en una realización, puede administrarse inicialmente una cantidad eficaz de la molécula CTLA4Ig una vez cada dos semanas durante un mes, y después una vez cada mes en lo sucesivo.

Una cantidad eficaz de molécula CTLA4Ig es una cantidad de aproximadamente 0,1 a 100 mg/kg de peso de un sujeto. En otra realización, la cantidad eficaz es una cantidad de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso de un sujeto. En una realización específica, la cantidad eficaz de CTL4Ig es de aproximadamente 2 mg/kg de peso de un sujeto. En otra realización específica, la cantidad eficaz de CTLA4Ig es de aproximadamente 10 mg/kg de peso de un sujeto. En otra realización específica, una cantidad eficaz de CTLA4Ig es 500 mg para un sujeto que pese menos de 60 kg, 750 mg para un sujeto que pese entre 60-100 kg y 1000 mg para un sujeto que pese más de 100 kg.

La solicitud de patente de Estados Unidos número de serie 60/668.774, presentada el 6 de abril de 2005 y la solicitud de patente de Estados Unidos número de serie 11/399.666, presentada el 6 de abril de 2006 enseñan la dosificación y el programa de administración para LEA29YIg que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 4 para tratar trastornos inmunitarios asociados con el trasplante de injertos.

Típicamente, las dosis de formulaciones de molécula CTLA4Ig se basan en el peso corporal, y los regímenes de administración pueden dictarse por los perfiles mínimos de suero diana. Típicamente, la concentración en suero mínima diana de moléculas LEA29YIg entre aproximadamente 3 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml durante los primeros 3 a 6 meses después del trasplante será suficiente para mantener la función del aloinjerto, preferentemente entre aproximadamente 5 µg/ml y aproximadamente 20 µg/ml. Típicamente, la concentración en suero mínima diana de las moléculas LEA29YIg durante la fase de mantenimiento es entre aproximadamente 0,2 µg/ml y aproximadamente 3 µg/ml, preferentemente entre aproximadamente 0,25 µg/ml y aproximadamente 2,5 µg/ml.

Las moléculas LEA29YIg pueden administrarse en una cantidad entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 20,0 mg/kg de peso del paciente típicamente entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 15,0 mg/kg. Por ejemplo, L104EA29YIg puede administrarse a 10 mg/kg de peso del paciente durante la fase temprana, el periodo de alto riesgo después del trasplante y reducirse a 5 mg/kg de peso del paciente para una dosificación de mantenimiento.

La administración de las moléculas CTLA4Ig de las formulaciones de la invención puede ser mediante una infusión intravenosa de 30 minutos a una o más horas. Como alternativa, la dosificación requerida puede suministrarse mediante de una a múltiples inyecciones subcutáneas. Típicamente, una infusión intravenosa de 30 minutos es la vía de administración utilizada durante la fase temprana del tratamiento mientras el paciente está en el hospital y/o realizando visitas programadas al profesional de cuidados sanitarios para su control. La inyección subcutánea es el modo de administración típico utilizado durante la fase de mantenimiento, permitiendo de este modo al paciente volver a su programa normal reduciendo las visitas a un profesional de cuidados sanitarios para infusiones intravenosas.

El ejemplo 10 describe la farmacocinética de la formulación de CTLA4Ig IV liofilizada en sujetos sanos y pacientes con artritis reumatoide (AR). La farmacocinética de abatacept en pacientes con AR y sujetos sanos parecía ser comparable. En pacientes con AR, después de múltiples infusiones intravenosas, la farmacocinética de abatacept mostró aumentos proporcionales de $C_{m\acute{a}x}$ y AUC sobre el intervalo de dosis de 2 mg/kg y 10 mg/kg. A 10 mg/kg, la concentración en suero parecía alcanzar un estado estacionario el día 60 con una concentración mínima media (intervalo) de 24 µg/ml (de aproximadamente 1 a aproximadamente 66 µg/ml). No se produjo acumulación sistémica de abatacept tras el tratamiento repetido continuado con 10 mg/kg a intervalos mensuales en pacientes con AR.

La invención se entenderá más completamente por referencia a los siguientes ejemplos. No deberían, sin embargo, interpretarse como limitantes del alcance de la invención. Todas las citas a lo largo de la divulgación se incorporan por la presente expresamente por referencia.

Ejemplo I

Se formula producto farmacológico de belatacept SC, 125 mg/ml (100 mg/vial) como una solución lista para usar, no pirogénica, estéril adecuada para administración subcutánea.

- 5 Se prepara producto farmacológico belatacept SC, 125 mg/ml (100 mg/vial) a una escala de 2,2 kg (1500 viales). La fórmula de lote se proporciona en la Tabla 7 dada a continuación.

TABLA 7

Fórmula de Lote Representativa	
Componente	Cantidad Por Lote (g)
Sustancia farmacológica belatacept ^b	250,0
Sacarosa	340,0
Poloxamer 188	16,0
Fosfato sódico monobásico, monohidrato	0,662
Fosfato sódico dibásico, anhídrido	2,13
Agua para Inyección	c.s. hasta 2,2 kg
Tamaño Total del Lote (kg)	2,2 kg ^a
^a Tamaño de lote total 2,2 kg (2 l). La densidad de la solución es 1,10 g/ml (a 20 °-25 °C)	
^b Sustancia farmacológica de belatacept: concentración proteica 25 mg/ml, fosfato sódico 25 mM, cloruro sódico 10 mM, pH de 7,5, <5 % de especies de APM	

- 10 El procedimiento de preparación de producto farmacológico de belatacept SC, producto farmacológico de 125 mg/ml (100 mg/vial) implica intercambio de tampón de la sustancia farmacológica a granel de tampón de fosfato sódico 25 mM, cloruro sódico 10 mM a un pH de 7,5 a tampón de fosfato sódico 10 mM pH 7,5, seguido de concentración de la proteína de ~25 mg/ml a ~150 mg/ml por retirada del tampón. El intercambio de tampón se consigue por diafiltración cinco veces de la sustancia farmacológica a granel frente al nuevo tampón de fosfato sódico 10 mM pH 7,5, seguido de concentración de la proteína a ~150 mg/ml por retirada del tampón. Se equipa un soporte de mini filtro Pellicon de acero inoxidable (Millipore) con manómetros de acero inoxidable y válvulas de membrana en el orificio de alimentación, retención y permeado. Se equipan dos casetes de filtración usados con mini módulo Pellicon con membrana de polietilensulfona Biomaz de 0,1 m² de área con límite de punto de corte de peso molecular nominal de 30 kDa. Los casetes de filtración se instalan de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El recipiente de alimentación para la sustancia farmacológica es un recipiente de vidrio de 4 litros con barra de agitación magnética. Se usan tubos de silicona de alto rendimiento MasterFlex para conectar el recipiente de alimentación con el soporte de filtro y para la línea de permeación. Se proporciona flujo de alimentación por una bomba peristáltica instalada en la línea de alimentación. Después se disuelven sacarosa y Poloxamer 188 en la solución proteica concentrada y se ajusta el peso de lote final con tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7,5. La solución en bruto se filtra a través de un filtro de esterilización de 0,22 micrómetros y se carga en viales de vidrio de sílex de Tipo I de 5 cm³ esterilizados y despirogenados, tapados con tapones de goma de 20 mm y sellados con sellos a presión de aluminio de 20 mm. La composición de producto farmacológico de belatacept SC, producto farmacológico de 125 mg/ml (100 mg/vial) se proporciona en la Tabla 8 dada a continuación.
- 15
- 20
- 25

TABLA 8

Composición de producto farmacológico de Belatacept SC, 125 mg/ml (100 mg/vial)	
Componente	Cantidad (mg/vial) ^d
Belatacept	140,0
Sacarosa	190,4
Poloxamer 188	8,96
Fosfato sódico monobásico, monohidrato	0,371
Fosfato sódico dibásico, anhídrido	1,193
Agua para Inyección	c.s. hasta 1,12 ml
^d Incluye 40 % de rebose para pérdida de Vial, Aguja, Jeringa	

Ejemplo II

Se formula producto farmacológico de abatacept SC, 125 mg/ml (125 mg/vial) como una solución lista para su uso, no pirogénica, estéril adecuada para administración subcutánea. Se prepara un lote de producto farmacológico de Abatacept SC, 125 mg/ml (125 mg/vial) a una escala de 5 l (3.500 viales). La fórmula de lote se describe en la Tabla 9 dada a continuación.

5

TABLA 9

Fórmula del Lote	
Componente	Cantidad (g)
Sustancia farmacológica de Abatacept ^a	625
Sacarosa	850
Poloxamer 188	40
Fosfato sódico monobásico, monohidrato	0,715
Fosfato sódico dibásico, anhídrido	4,86
Agua para Inyección	c.s. hasta 5,0 l
Tamaño de Lote Total (l)	5,0
^a Sustancia farmacológica de abatacept: concentración proteica 50 mg/ml, fosfato sódico 25 mM, cloruro sódico 50 mM, pH de 7,5, <5 % de especies de APM	

Como se ha descrito anteriormente en el ejemplo I, el procedimiento de preparación de producto farmacológico de Abatacept SC, 125 mg/ml (125 mg/vial) implica intercambio de tampón de la sustancia farmacológica a granel de fosfato sódico 25 mM, cloruro sódico 50 mM a un pH de 7,5 a un tampón de fosfato sódico 10 mM pH 7,8, seguido de concentración de la proteína de ~50 mg/ml a ~150 mg/ml mediante retirada del tampón. Después se disuelven la Sacarosa y el Poloxamer 188 en la solución de proteína concentrada y se ajusta el peso del lote final con tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7,8. La solución en bruto se filtra a través de un filtro de esterilización de 0,22 micrómetros y se carga en viales de vidrio de sílex de Tipo I de 5 cm³ esterilizados y despirogenados, tapados con tapones de goma de 20 mm y sellados con sellos a presión de aluminio de 20 mm.

10

La composición de producto farmacológico de Abatacept SC, 125 mg/ml (125 mg/vial) se proporciona en la Tabla 10 dada a continuación.

15

TABLA 10

Composición de producto farmacológico de Abatacept SC, 125 mg/ml (125 mg/vial)	
Componente	Cantidad (mg/vial) ^c
Abatacept	175
Sacarosa	238
Poloxamer 188	11,2
Fosfato sódico monobásico, monohidrato	0,20
Fosfato sódico dibásico, anhídrido	1,36
Agua para Inyección	c.s. hasta 1,4 ml
^c Incluye 40 % de rebose para pérdida de Vial, Aguja, Jeringa	

Ejemplo V

Se realizaron estudios de estabilidad de la formulación líquida SC de producto farmacológico de Belatacept estabilizando formulaciones a diferentes temperaturas y durante diversos periodos de tiempo.

20

Efecto de la sacarosa

5 Se realizaron estudios de desarrollo de la formulación para evaluar el efecto de diversos niveles de sacarosa en la estabilidad de la solución del producto farmacológico de belatacept. Las muestras se estabilizaron en condiciones de -70 °C, 8 °C y 25 °C/ humedad del 60 % y se controlaron en diversos puntos temporales. Las relaciones de proteína y sacarosa evaluadas fueron 1:1, 1:1,7 y 1:1,75. La formación de especies de alto peso molecular (APM) de belatacept se utilizó para determinar la estabilidad proteica en solución. Los resultados se muestran en la Tabla 16 dada a continuación.

TABLA 16

Efecto de diversos niveles de sacarosa en el producto farmacológico de Belatacept a 100 mg/ml					
Condiciones de Almacenamiento	Tiempo/Meses	% de Especies de Alto Peso Molecular			
		Control ^a	1:1	1:1,75	1:1,7
Inicial	0	1,11	1,07	1,05	1,06
-70 °C	3	1,18	1,09	1,07	1,09
8 °C	1	1,22	1,10	1,08	1,07
	2	1,34	1,15	1,08	1,09
	3	ND	1,24	1,15	1,17
	6	1,78	1,39	1,23	1,24
	9	2,02	1,53	1,34	1,34
	12	2,06	1,49	1,26	1,24
25 °C/60 % de HR	0	1,11	1,07	1,05	1,06
	1	2,73	1,83	1,48	1,56
	2	3,98	2,41	1,84	1,87
	3	4,88	3,02	ND	2,23
	6	7,44	4,56	3,21	ND

^aproducto farmacológico de Belatacept en tampón de fosfato sódico 10 mM, 100 mg/ml, pH 7,5

10 Los resultados de los estudios mostraron que el aumento de la relación de sacarosa y proteína mejoró la estabilidad proteica. Se seleccionó una relación de proteína y sacarosa de 1:1,36 (p:p) para el desarrollo de la solución SC debido a que proporcionaba estabilidad óptima sin dar como resultado producto farmacológico con hipertonicidad excesiva.

Efecto de los tensioactivos

15 Se evaluó el efecto de diversos tensioactivos en productos comercializados, tales como, Polisorbato 80 y Poloxamer 188 sobre la estabilidad de la solución de producto farmacológico de belatacept. El Poloxamer 188 se evaluó a los niveles de 4, 6 y 8 mg/ml y el Polisorbato 80 se evaluó a 1 y 2 mg/ml de la concentración de formulación final. Las muestras se estabilizaron a -70 °C, 8 °C y 25 °C/condiciones de humedad del 60 % y se controlaron en diversos puntos temporales. Los resultados se muestran en la Tabla 17 dada a continuación.

TABLA 17

Efecto de diversos niveles y tipos de tensioactivo en el producto farmacológico de Belatacept (100 mg/ml)							
Condiciones de Almacenamiento	Tiempo/Meses	% de Especies de Alto Peso Molecular					
		Control ^a	Poloxamer 188 mg/ml			Polisorbato 80 mg/ml	
			4	6	8	1	2
Inicial	0	1,11	1,06	1,07	1,07	1,08	1,08
-70 °C	3	1,18	1,09	ND	1,09	1,11	1,15

20

(continuación)

Efecto de diversos niveles y tipos de tensioactivo en el producto farmacológico de Belatacept (100 mg/ml)							
Condiciones de Almacenamiento	Tiempo/Meses	% de Especies de Alto Peso Molecular					
		Control ^a	Poloxamer 188 mg/ml			Polisorbato 80 mg/ml	
			4	6	8	1	2
8 °C	1	1,22	1,10	1,08	1,09	1,10	1,12
	2	1,34	1,09	1,10	1,11	1,12	1,12
	3	ND	1,19	1,18	1,18	1,21	1,28
	6	1,78	1,27	1,23	1,25	1,29	1,30
	9	2,02	1,34	1,33	1,34	1,42	1,40
	12	2,06	1,28	1,25	1,27	1,38	1,36
25 °C/60 % de HR	0	1,11	1,06	1,07	1,07	1,08	1,08
	1	2,73	1,52	1,52	1,52	1,55	1,55
	2	3,98	1,91	1,89	1,89	1,99	1,97
	3	4,88	2,31	2,29	2,24	2,56	2,50
	6	7,44	3,39	4,05	ND	3,89	3,90

^aproteína:sacarosa (1:1,7), 100 mg/ml, pH 7,5

Los resultados del efecto de los tensioactivos sugirieron que el tensioactivo no tenía un efecto significativo sobre la estabilidad de la solución del producto farmacológico de belatacept. Entre los niveles de Poloxamer 188 evaluados, se descubrió que la concentración de 8 mg/ml era adecuada para evitar la formación de partículas relacionadas con silicón en la formulación.

Efecto del pH

Se evaluó la estabilidad del producto farmacológico de Belatacept SC, (125 mg/ml, proteína:sacarosa 1:1,36, Pluronic F68 8 mg/ml) en función del pH. El pH de la solución se ajustó entre 7 y 8,2 con hidróxido sódico 1 N o ácido clorhídrico 1 N. Las muestras se estabilizaron en condiciones de 2 °-8 °C y 25 °C/60 % de HR y se controlaron en diversos puntos temporales. Los ensayos analíticos incluyeron pH y SE-HPLC para controlar el aumento de las especies de alto peso molecular (APM). Estos resultados se resumen en la Tabla 18 dada a continuación.

TABLA 18

Efecto del pH en el producto farmacológico de Belatacept SC*					
Condiciones	Tiempo/Meses	% de Especies de Alto Peso Molecular			
		pH 7,0	pH 7,4	pH 7,8	pH 8,2
Inicial	0	1,31	1,18	1,16	1,28
2-8 °C	1	1,34	1,23	1,25	1,44
	2	1,42	1,29	1,31	1,56
	3	1,48	1,35	1,36	1,59
25 °C/60 % de HR	1	2,09	2,62	2,13	2,52
	2	7,04	5,68	5,89	6,40
	3	9,98	6,13	ND	7,81

* proteína:sacarosa (1:1,36), 125 mg/ml, + Pluronic F68 8 mg/ml

No se observaron cambios significativos en la velocidad de formación de especies de APM en las condiciones de almacenamiento recomendadas de 2-8 °C. Adicionalmente, los datos de estabilidad de estado de solución mostraron que el pH de máxima estabilidad estaba entre 7 y 8. Basándose en esto, se seleccionó un intervalo de pH de 7-8 con un pH diana de 7,5 para esta formulación.

Osmolalidad

La osmolalidad de soluciones de producto farmacológico de belatacept en diversos tampones, a diferentes concentraciones de proteína y de etapas diferentes del procedimiento de formulación se midió usando un

procedimiento de presión de vapor. Estos resultados se resumen en la Tabla 19 dada a continuación.

TABLA 19

Determinación de Osmolalidad de Solución de Producto Farmacológico de Belatacept en Diversos Tampones y Concentraciones				
Belatacept/Tampón/Excipientes	Concentración de proteína (mg/ml)	Fosfato Sódico	Cloruro Sódico	Osmolalidad (mOsm/kg)
Belatacept API, tal cual	25	25 mM	10 mM	89
Belatacept, etapa de Diafiltración	25	10 mM	-	40
Belatacept, etapa de Diafiltración/Concentración	138	10 mM	-	58
Belatacept en agua	25	-	-	17
Belatacept en agua	100	-	-	27
Belatacept:Sacarosa (1:1)	100	10 mM	-	424
Belatacept:Sacarosa (1:1,7)	100	10 mM	-	737
Belatacept:Sacarosa (1:1,75)	100	10 mM	-	769
Belatacept:Sacarosa (1:2)	100	10 mM	-	870
Belatacept:Sacarosa (1:1,36)	125	10 mM	-	770

Efecto de la agitación/sacudida

- 5 Se determinó el efecto de la agitación en la estabilidad de la solución de producto farmacológico de belatacept SC a una concentración de 100 mg/ml y 125 mg/ml. Se agitaron alícuotas de la solución que contenían aproximadamente 1 ml en viales de tubos de 5 cm³ a velocidad 3 de agitador de brazo y muñeca a 2-8 °C. La temperatura del agitador se mantuvo a 2-8 °C colocando el agitador en la cámara frigorífica. Se extrajeron muestras a intervalos de tiempo apropiados y se ensayaron con respecto a pH y apariencia visual, y se evaluaron muestras del mismo tiempo con respecto a bioactividad después de 30 días de agitación.
- 10 Las muestras agitadas a concentración de 100 mg/ml y 125 mg/ml durante hasta 30 días no mostraron cambios en el nivel de especies de APM, en el perfil de SDS-PAGE, mapeo peptídico, ensayo de unión de B7, pH, apariencia o concentración proteica cuando se agitaron a 2-8 °C.

Efecto de múltiples congelaciones/descongelaciones

- 15 El efecto de múltiples congelaciones y descongelaciones en la estabilidad de la formulación de producto farmacológico belatacept SC se investigó en muestras con pH que variaba de 7,0 a 8,2. Se distribuyeron alícuotas de aproximadamente 10 µl de formulación de producto farmacológico de belatacept SC (125 mg/ml) a pH 7,0, 7,4, 7,8 y 8,2 en recipientes de Nalgene PETG de 30 ml. Se realizaron múltiples congelaciones y descongelaciones almacenando los viales a -70 °C seguido de descongelación a temperatura ambiente (25 °C) durante 10 minutos. Este ciclo se repitió durante 5 días. Los contenidos de los viales se analizaron con respecto a pH, % de especies de APM y apariencia después de cada ciclo de congelación/descongelación.
- 20

No se observaron cambios en el pH, apariencia o % de especies de alto peso molecular en las muestras durante cinco ciclos de congelación/descongelación.

Condiciones de almacenamiento recomendadas

- 25 Las condiciones de almacenamiento recomendadas para producto farmacológico de Belatacept SC, 100 mg/vial (125 mg/ml) son de 2-8 °C con un periodo de almacenamiento recomendado de 12 meses.

Estudio de inyectabilidad

- 30 Se realizó un estudio de inyectabilidad con producto farmacológico de belatacept SC (125 mg/ml) a condiciones de 2 °- 8 °C. Se evaluaron diversos tamaños de aguja con jeringa de 1 ml y 0,5 ml. El tiempo de llenado de la jeringa y la fuerza de suministro se registran en la Tabla 20 dada a continuación.

TABLA 20

Estudio de Inyectabilidad de producto farmacológico de Belatacept SC, 125 mg/ml a 2 ^o -8 °C			
Tamaño de la jeringa	Tamaño de la aguja	Tiempo de Llenado (Segundos)	Fuerza de Suministro
1 ml	27G 1,27 cm	25	Moderada
Aguja fija de 1 ml (Insulina)	28G 1,27 cm	52	Moderada
Aguja fija de 1 ml (Insulina)	29G 1,27 cm	50	Moderada
Aguja fija de 0,5 ml (Insulina)	30G	42 (94 para 1 ml)	Alta

Basándose en los resultados del estudio de inyectabilidad mostrados en la Tabla 20, se recomienda una aguja hipodérmica estéril de calibre 21 x 3,81 cm para extracción de este producto del vial y una aguja de calibre 27 x 1,27 cm para dosificación posterior.

5 Ejemplo VIII

Se realizaron estudios de estabilidad de la formulación SC de producto farmacológico de Abatacept estabilizando formulaciones a temperaturas diferentes y durante diversos periodos de tiempo.

Efecto de la concentración del tampón

- 10 Se evaluó la estabilidad de producto farmacológico de Abatacept SC (100 mg/ml) en función de la concentración del tampón. El sistema de tampón fue tampón fosfato 5 o 10 mM. Las muestras se estabilizaron en condiciones de 2^o-8 °C y 30 °C/60 % de HR y se controlaron en diversos puntos temporales. Los ensayos analíticos incluyeron pH y SE-HPLC para controlar el aumento de las especies de alto peso molecular (APM). Estos resultados se resumen en la Tabla 25 dada a continuación.

TABLA 25

Efecto de la concentración del tampón en el producto farmacológico de Abatacept (100 mg/ml, pH 7,5)			
Condiciones de Almacenamiento	Tiempo/Meses	% de Especies de Alto Peso Molecular	
		En tampón fosfato 10 mM	En tampón fosfato 5 mM
Inicial	0	1,30	1,47
2-8 °C	1	1,49	1,74
	2	1,60	1,98
	3	1,73	2,23
30 °C/60 % de HR	0	1,30	1,47
	0,5	8,73	14,39
	1	14,63	23,24
	2	25,26	32,25

- 15 La estabilidad del producto farmacológico de abatacept SC fue mejor en tampón fosfato 10 mM en comparación con tampón fosfato 5 mM a pH 7,5 a concentración de abatacept 100 mg/ml. Además la capacidad de tamponamiento mayor del tampón fosfato 10 mM ofreció mejor control del pH de la formulación en comparación con el tampón 5 mM. Basándose en los datos, se seleccionó el tampón fosfato 10 mM para desarrollo de la formulación.

Efecto de los azúcares

- 20 Se realizaron estudios de desarrollo de formulación para evaluar el efecto de diversos azúcares en la estabilidad del producto farmacológico de abatacept SC. Las muestras se estabilizaron en condiciones de 2^o-8 °C y 30 °C/60 % de humedad y se controlaron en diversos puntos temporales. Los azúcares evaluados fueron sacarosa, trehalosa y manitol. La formación de especies de alto peso molecular (APM) de abatacept se utilizó para determinar la estabilidad proteica en solución. Los resultados se muestran en la Tabla 26 dada a continuación.

TABLA 26

Efecto de diversos azúcares en el producto farmacológico de Abatacept SC a 100 mg/ml, pH 7,5					
Condiciones de Almacenamiento	Tiempo/Meses	% de Especies de Alto Peso Molecular			
		Control ^a	Sacarosa 1:1	Trehalosa 1:1	Manitol 1:1 ^b
Inicial	0	1,30	1,18	1,20	1,20
2-8 °C	1	1,49	1,37	1,38	1,25
	2	1,60	1,40	1,41	1,26
	3	1,73	1,45	1,48	1,60
	6	2,10	1,54	N/D	N/D
	11,5	2,57	N/D	N/D	N/D
30 °C/60 % de HR	0	1,30	1,18	1,20	1,30
	0,5	8,73	4,31	4,34	3,59
	1	14,63	7,20	8,09	5,72
	2	25,26	11,97	14,21	10,14

^a producto farmacológico de Abatacept en tampón de fosfato sódico 10 mM, 100 mg/ml, pH 7,5.
^b Formulación de manitol a pH 7,8

Los resultados de los estudios mostraron que los tres azúcares sacarosa, trehalosa y manitol ofrecían mejor estabilización a abatacept en comparación con el control sin azúcar. Los resultados de los estudios en condiciones aceleradas de 30C mostraron que el manitol ofrecía mejor estabilización al abatacept en comparación con sacarosa y trehalosa. La sacarosa era ligeramente mejor que la trehalosa. En refrigeración, la estabilización por los tres azúcares no fue significativamente diferente. Se eligió la sacarosa como el azúcar de elección puesto que la formulación de manitol tenía dos veces la tonicidad de la formulación de sacarosa. La elección de sacarosa para estabilización permitiría la adición del doble de sacarosa para conseguir la misma tonicidad que manitol a la misma relación pero mucha mayor estabilización contra agregación. Se eligió una relación de proteína:sacarosa de 1:1,36 (p:p) para el desarrollo del producto farmacológico SC debido a que proporcionaba estabilidad óptima sin dar como resultado un producto farmacológico con excesiva hipertonicidad.

Efecto de la sacarosa

Se realizaron estudios de desarrollo de formulación para evaluar el efecto de diversos niveles de sacarosa en la estabilidad en solución del producto farmacológico de abatacept SC. Se estabilizaron muestras en condiciones de 2-8 °C y 30 °C/60 % de humedad y se controlaron en diversos puntos temporales. Las relaciones de proteína y sacarosa evaluadas fueron 1:1 y 1:2. La formación de especies de alto peso molecular (APM) de abatacept se utilizó para determinar la estabilidad proteica en solución. Los resultados se muestran en la Tabla 27 dada a continuación.

TABLA 27

Efecto de diversos niveles de sacarosa en el producto farmacológico de Abatacept SC a 100 mg/ml, pH 7,5				
Condiciones de Almacenamiento	Tiempo/Meses	% de Especies de Alto Peso Molecular		
		Control ^a	1:1	1:2
Inicial	0	1,30	1,18	1,17
2-8 °C	1	1,49	1,37	1,33
	2	1,60	1,40	1,21
	3	1,73	1,45	1,23
	6	2,10	1,54	1,29
	11,5	2,57	N/D	N/D

(continuación)

Efecto de diversos niveles de sacarosa en el producto farmacológico de Abatacept SC a 100 mg/ml, pH 7,5				
Condiciones de Almacenamiento	Tiempo/Meses	% de Especies de Alto Peso Molecular		
		Control ^a	1:1	1:2
30 °C/60 % de HR	0	1,30	1,18	1,17
	0,5	8,73	4,31	2,41
	1	14,63	7,20	3,69
	2	25,26	11,97	6,59

^a producto farmacológico de Abatacept en tampón de fosfato sódico 10 mM, 100 mg/ml, pH 7,5

Los resultados de los estudios mostraron que el aumento de la relación de sacarosa y proteína mejoraba la estabilidad proteica. Se eligió una relación de proteína:sacarosa de 1:1,36 (p:p) para el desarrollo de la solución de RTU debido a que proporcionaba estabilidad óptima sin dar como resultado producto farmacológico con excesiva hipertonidad.

Efecto de los tensioactivos

Se evaluó el efecto de diversos tensioactivos en productos comercializados, tales como, Polisorbato 80 (Tween[®] 80) y Poloxamer 188 (Pluronic[®] F68) en la estabilidad en solución del producto farmacológico de abatacept. Se evaluó el Poloxamer 188 a niveles de 4 y 8 mg/ml y el Polisorbato 80 se evaluó a 1 y 2 mg/ml de concentración de formulación final. Las muestras se estabilizaron en condiciones de -2-8 °C y 25 °C/60 % de humedad y se controlaron en diversos puntos temporales. Los resultados se muestran en la Tabla 28 dada a continuación.

TABLA 28

Efecto de diversos niveles y tipos de tensioactivo en el producto farmacológico de abatacept SC a 125 mg/ml						
Condiciones de Almacenamiento	Tiempo/Meses	% de Especies de Alto Peso Molecular				
		Control ^a	Poloxamer 188 mg/ml		Polisorbato 80 mg/ml	
			4	8	1	2
Inicial	0	1,05	1,05	1,06	1,07	1,10
2-8 °C	1	0,98	0,99	0,99	1,01	1,02
	2	1,02	1,03	1,04	1,05	1,07
	3	1,06	1,07	1,08	1,08	1,09
	6	1,23	1,27	1,28	1,25	1,32
	9	1,30	1,35	1,36	1,34	1,36
25 °C/60 % de HR	0	1,05	1,05	1,06	1,03	1,04
	1	1,92	1,94	1,92	1,97	2,02
	2	2,69	2,71	2,68	2,75	2,80
	3	3,74	3,92	3,67	3,84	3,84
	5	5,12	5,16	5,03	5,05	5,03

^a proteína:sacarosa (1:1), 125 mg/ml, pH 7,8

Los resultados del efecto de los tensioactivos sugirieron que el tensioactivo no tenía un efecto negativo significativo en la estabilidad del producto farmacológico de abatacept SC. Entre los niveles de Poloxamer 188 evaluados, se descubrió que la concentración de 8 mg/ml era adecuada para evitar la formación de partículas relacionadas con silicona en la formulación.

Osmolalidad

Se midió la osmolalidad de abatacept en diversos tampones, a concentraciones proteicas diferentes y de etapas separadas del procedimiento de formulación usando un procedimiento de presión de vapor. Estos resultados se resumen en la Tabla 29 dada a continuación.

5

TABLA 29

Determinación de Osmolalidad de Solución de Abatacept SC en Diversos Tampones y Concentraciones				
Abatacept/Tampón/ Excipientes	Concentración proteica (mg/ml)	Fosfato Sódico	Cloruro Sódico	Osmolalidad (mOsm/kg)
Sustancia farmacológica de Abatacept	50	25 mM	50 mM	151
Abatacept, etapa de Diafiltración	50	10 mM	-	32
Abatacept, etapa de Diafiltración/Concentra ción	155	10 mM	-	49
Tampón fosfato 10 mM pH 7,8	-	10	-	35
Abatacept en agua	100	10 mM	-	51
Abatacept:Sacarosa (1:1)	100	10 mM	-	567
Abatacept:Sacarosa (1:1,75)	100	10 mM	-	766
Abatacept:Sacarosa (1:2)	100	10 mM	-	913
Abatacept:Sacarosa (1:1,36)	125	10 mM	-	782

Efecto de la agitación/sacudida

10

Se determinó el efecto de la agitación en la estabilidad en solución del producto farmacológico de abatacept SC a concentración de 100 mg/ml y 125 mg/ml. Se agitaron alícuotas de la solución que contenían aproximadamente 1 ml en viales de tubos de 5 cm³ a velocidad 3 de agitador de brazo y muñecas a 2-8 °C. La temperatura del agitador se mantuvo a 2-8 °C colocando el agitador en la cámara frigorífica. Se retiraron muestras a intervalos temporales apropiados y se ensayaron con respecto a pH y apariencia visual, y se evaluaron también muestras del mismo tiempo con respecto a bioactividad después de 30 días de agitación.

15

Las muestras agitadas a concentración de 100 mg/ml y 125 mg/ml durante hasta 30 días no mostraron cambios en el nivel de especies de APM, en el perfil de SDS-PAGE, mapeo peptídico, ensayo de unión de B7, pH, apariencia o concentración proteica cuando se agitaron a 2-8 °C.

Condiciones de almacenamiento recomendadas

Las condiciones de almacenamiento recomendadas para producto farmacológico de abatacept SC, 125 mg/Jeringa (125 mg/ml) son de 2-8 °C con un periodo de caducidad recomendado de al menos 12 meses.

Ejemplo IX

20

La desamidación y agregación son dos rutas de degradación observadas de las moléculas CTLA4Ig. Este protocolo perfila un estudio de estabilidad de pH a escala de laboratorio diseñado para evaluar la formulación de producto farmacológico SC en el intervalo de pH de 6,3-7,2, específicamente pH 6,3, 6,6, 6,9, 7,2. El fin de este estudio es identificar la formulación de menor pH óptima que conseguirá un mínimo de 18 meses de periodo de caducidad para las formulaciones de CTLA4Ig SC con respecto a la desamidación y formación de especies de alto peso molecular.

25

La formación de producto farmacológico SC utilizada en este estudio se describe en la Tabla 30 dada a continuación.

TABLA 30

Composición de formulación de producto farmacológico SC a pH 6,9	
Ingrediente	Cantidad mg/1,0 ml
abatacept	125
Sacarosa	170
Poloxamer 188	8
Fosfato sódico monobásico, monohidrato	0,638
Fosfato sódico dibásico, anhídrido	0,475
Agua para Inyección	CS 1,0 ml

El producto farmacológico de abatacept SC se formulará a pH 6,3, 6,6, 6,9, 7,2. El producto farmacológico se formulará con sacarosa y poloxamer 188 como se ha descrito anteriormente y la concentración de lote final se ajustará con tampón fosfato 10 mM (pH 6,9). El pH se valorará hasta 6,3 y 6,6, respectivamente, usando HCl 1 N. Como alternativa, el pH se valorará hasta 6,9, 7,2 y 7,65 con NaOH 1 N. el producto farmacológico se cargará en jeringas PhysioliTM largas de 1 ml (volumen de carga de 1,0 ml) y se colocarán en estaciones de estabilidad a 2-8 °C, 15 °C, 25 °C a 60 % de humedad, y 35 °C. Las muestras deberían protegerse de la luz en todo momento cubriéndolas o insertándolas en bolsas protectoras de la luz marrones.

Se tomarán muestras del producto farmacológico almacenado a 2-8 °C a los 0, 2, 4, 6, 12, 18, 24 meses y opcionalmente 9 meses. Se tomarán muestras del producto farmacológico almacenado a 15 °C a los 1, 2, 4, 6 meses y opcionalmente 9 meses. Se tomarán muestras del producto farmacológico almacenado a 25 °C y 60 % de humedad a los 1, 2, 4 y 6 meses. Se tomarán muestras del producto farmacológico a 35 °C a los 1, 2 y 4 meses. Las muestras almacenadas a 2-8 °C se ensayarán con respecto a apariencia (solamente muestras inicial y final), pH (solamente muestras inicial, de 4 meses y final), A280 (solamente muestras inicial, de 4 meses y última), HPLC de exclusión por tamaño, SDS- PAGE, mapeo peptídico con digestión triptica (TPM), Unión de B7 de Biacore (solamente muestras inicial, de 4 meses y final o según se necesiten) e isoelectroenfoque (IEF) (solamente muestras inicial y final). Las muestras almacenadas a 15 °C y 25 °C y 60 % de humedad se ensayarán con respecto a A280 (solamente muestras inicial, de 4 meses y final), HPLC de exclusión por tamaño, SDS- PAGE y mapeo peptídico por digestión triptica (TPM). Las muestras almacenadas a 35 °C se ensayarán con respecto a HPLC de exclusión por tamaño, SDA- PAGE y mapeo peptídico por digestión triptica (TPM).

Se usaron procedimientos de ensayo no rutinarios para caracterizar adicionalmente las muestras de estabilidad en el punto temporal inicial, a los 4 meses, a los 12 meses y al final del estudio. Algunos de estos procedimientos también pueden usarse para ensayar muestras específicas si se observa una tendencia o un resultado inesperado. Los procedimientos no rutinarios incluyen: cromatografía de exclusión por tamaño que emplea dispersión de la luz multiángulo (SEC-MALS), unión cinética (SPR), Espectrometría de Masas, CD, AUC, Calorímetro de Exploración Diferencial (DSC), FFF, FTIR, HPLC de exclusión por tamaño (desnaturalizado) y SDS-PAGE (tinción con plata).

Ejemplo XI

Los objetivos de este estudio son evaluar la PK de belatacept después de una única dosis de SC en el intervalo de 50 a 150 mg en sujetos sanos; evaluar los efectos del volumen de inyección y la concentración de la solución inyectada en la PK de belatacept administrado por vía subcutánea; evaluar la seguridad y tolerabilidad (incluyendo la evaluación de sitio de inyección) de una única dosis SC de belatacept; evaluar la inmunogenicidad de belatacept administrado por vía subcutánea.

Este es un estudio de doble ciego, aleatorio, controlado por placebo, en grupos paralelos, de dosis individual en sujetos sanos. Se seleccionará un total de 42 sujetos de forma aleatoria en uno de 6 grupos de tratamiento. Dentro de cada grupo de 7 sujetos, los sujetos se seleccionarán aleatoriamente en una relación 5:2 el Día 1 para recibir una única inyección SC de belatacept o placebo. Se requerirá que los sujetos pesen \leq 100 kg. Los 6 grupos de tratamiento se describen en la Tabla 34.

TABLA 34

Grupos de Tratamiento			
Grupo de Tratamiento	Dosis de belatacept o Placebo	Volumen de Inyección	Concentración de la Solución Inyectada
1	50 mg	0,4 ml	125 mg/ml
2	75 mg	0,6 ml	125 mg/ml

(continuación)

Grupos de Tratamiento			
Grupo de Tratamiento	Dosis de belatacept o Placebo	Volumen de Inyección	Concentración de la Solución Inyectada
3	100 mg	0,8 ml	125 mg/ml
4	150 mg	1,2 ml	125 mg/ml
5	50 mg	1,0 ml	50 mg/ml
6	75 mg	1,0 ml	75 mg/ml

Los sujetos se someterán a evaluaciones de exploración para determinar su elegibilidad en un periodo de 28 días desde la dosificación el Día 1. Los sujetos se admitirán en la instalación clínica el día antes de la dosificación (Día -1) para evaluaciones de línea basal, incluyendo MLR. Los sujetos permanecerán en la instalación clínica hasta la 5
compleción de las evaluaciones postratamiento el Día 5, y volverán a la instalación clínica para cada visita de estudio en lo sucesivo hasta su alta del estudio.

El Día 1 los sujetos se seleccionarán aleatoriamente para el tratamiento y recibirán una única dosis SC de belatacept o placebo, y se someterán a toma de muestras de PK e inmunogenicidad detalladas. Todos los sujetos recibirán las inyecciones SC en el muslo anterior. Después de la administración del fármaco del estudio, el investigador evaluará 10
el sitio de inyección con respecto a señales de irritación local e inflamación.

Se realizarán exámenes físicos, mediciones de constantes vitales y evaluaciones de laboratorio clínico en momentos seleccionados a lo largo del estudio. Se recogerán muestras sanguíneas durante hasta 56 días después de la administración del fármaco para análisis de PK y evaluación de inmunogenicidad. Los sujetos se controlarán con respecto a AE a lo largo del estudio. Se extraerán aproximadamente 265 ml de sangre de cada sujeto durante el 15
estudio.

La dosificación y seguimiento se realizarán simultáneamente para todos los grupos de dosis. Ningún sujeto recibirá más de una dosis individual. Los sujetos que no completan el estudio (excepto los que lo interrumpan por AE) pueden reemplazarse.

Este es un estudio de dosis individual. Cada sujeto se someterá a un periodo de exploración que será de un máximo de 28 días antes del día en que se administre el fármaco del estudio. Cada sujeto permanecerá en el estudio hasta la última visita, 56 Días (\pm 2 Días) después de que se administre el fármaco del estudio. La última visita del último 20
sujeto que se someta al ensayo se considerará el final del estudio.

Belatacept 100 mg/vial (125 mg/ml), como se describe en el presente documento, y preparado como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos N° de Serie 60/849543, en tramitación, presentada el 5 de octubre de 2006 que enseña procedimientos para la producción de proteínas de la invención, específicamente productos glicoproteicos recombinantes, por cultivos celulares de mamíferos o animales, es un producto líquido listo para usar proporcionado en un vial de vidrio para retirada y administración usando una jeringa y aguja convencional de tamaño adecuado para administración SC. Se incorpora un exceso suficiente de belatacept a cada vial para compensar pérdidas de extracción de modo que puedan extraerse 0,8 ml de la solución que contengan 100 mg para 25
administración SC.

No se pretende usar Inyección de Belatacept, 100 mg/vial (125 mg/ml) para una infusión IV.

Serán elegibles para participar en el estudio sujetos sanos como se determina por su historial médico, examen físico, electrocardiograma de 12 derivaciones, y evaluaciones de laboratorio clínico. Este estudio incluirá hombres y mujeres. Los sujetos deben ser de al menos 18 años de edad y pesar \leq 100 kg en el momento de la selección aleatoria. Los sujetos femeninos no deben estar en lactancia, embarazadas y deben usar un procedimiento aceptable de anticoncepción durante al menos 1 mes antes de la dosificación, durante el estudio y durante hasta 4 35
semanas después del final del estudio. Las mujeres con potencial para tener hijos deben tener un ensayo de embarazo en suero negativo en un periodo de 24 horas antes de la dosis de la medicación del estudio. Se avisará a los sujetos sobre los riesgos potenciales de un embarazo. Los sujetos masculinos deben usar un procedimiento adecuado de anticoncepción durante el estudio y durante hasta 4 semanas después del final del estudio de modo que se minimice el riesgo de embarazo para su pareja. Véase Sección 5 para una lista detallada de los criterios de inclusión y exclusión.

Las medicaciones tomadas en un periodo de 4 semanas antes de la admisión deben registrarse en el CRF. No deben administrarse durante el estudio medicaciones conjuntas (prescripción, sin receta o herbales), excepto anticonceptivos orales, a no ser que se prescriban por el investigador para el tratamiento de acontecimientos clínicos 45
específicos. Debe registrarse cualquier terapia conjunta en el CRF.

La PK de belatacept después de inyección SC derivará de los datos de concentración en suero frente al tiempo. Los parámetros PK de dosis individual para evaluar incluyen:

C _{máx}	Concentración en suero observada máxima
T _{máx}	Tiempo de concentración en suero observada máxima
AUC(0-T)	Área bajo la curva de concentración en suero-tiempo desde el tiempo cero hasta el momento de la última concentración cuantificable
AUC(INF)	Área bajo la curva de concentración en suero-tiempo desde el tiempo cero extrapolado hasta tiempo infinito
Semivida	Semivida en suero
CLT/F	Eliminación del cuerpo total aparente
VSS/F	Volumen aparente de distribución en estado estacionario

Los valores de parámetros PK de sujetos individuales se derivarán por procedimientos no compartimentales por un programa de análisis PK validado, el programa eToolbox Kinetica, Innaphase Corp, Filadelfia, PA. También se indicará la AUC normalizada por dosis.

5 Se recogerán muestras de suero a lo largo del tiempo y se ensayarán con respecto a la presencia de títulos de anticuerpo para belatacept usando dos ensayos ELISA. Un ensayo evalúa la respuesta a la molécula completa y el otro solamente a la parte LEA29Y-T.

10 Todos los sujetos que reciben medicación del estudio se incluirán en los conjuntos de datos de seguridad y PD. Los sujetos que reciban placebo en cualquier panel se agruparán en un único grupo de tratamiento de placebo con respecto a evaluaciones de PD y evaluaciones de seguridad excepto para las evaluaciones del sitio de inyección. Todos los datos disponibles de sujetos que reciban belatacept se incluirán en el conjunto de datos PK, y se incluirán en el sumario de la estadística y el análisis estadístico.

La línea basal se considera el Día -1. Las distribuciones de frecuencia de sexo y raza se tabularán por tratamiento (volumen de inyección y dosis). El sumario de la estadística con respecto a edad, peso corporal y altura se tabulará por tratamiento.

15 Todos los AE registrados se enumerarán y se tabularán por término preferido, clase de órgano del sistema y tratamiento. Las constantes vitales y los resultados de ensayo de laboratorio clínico se enumerarán y se resumirán por tratamiento. Se enumerará cualquier hallazgo del examen físico y resultados de laboratorio clínico significativos. Las evaluaciones del sitio de inyección (eritema, calor, hinchazón, dolor y prurito) se tabularán por tratamiento y grado de gravedad. Los sujetos con placebo se agruparán entre grupos de dosis y se analizarán independientemente, así como con respecto a la evaluación del sitio de inyección.

20 El sumario de la estadística se tabulará con respecto a los parámetros PK por tratamiento. Las medias geométricas y los coeficientes de variación se presentarán para C_{máx}, AUC(0-T) y AUC(INF). Las medianas, mínima y máxima se presentarán para T_{máx}. Las medias y las desviaciones típicas se proporcionarán para otros parámetros PK. Para evaluar la dependencia de la dosis después de administración SC, se proporcionarán representaciones de dispersión de C_{máx} y AUC(INF) frente a dosis. Se construirán representaciones de dispersión de AUC(INF) y C_{máx} entre volúmenes de inyección para evaluar este efecto en la PK de belatacept. Además, se proporcionarán representaciones de dispersión de C_{máx} y AUC(INF) frente a dosis para un volumen fijado, y C_{máx} y AUC(INF) frente a volumen dentro de las dosis cuando sea aplicable.

25 En el sumario de la estadística se tabulará por tratamiento y día del estudio con respecto a valores de anticuerpo anti belatacept y anti LEA29Y-T y sus cambios desde la línea basal (Día 1-0 horas). Para explorar posibles asociaciones entre la inmunogenicidad y la exposición, se proporcionarán representaciones de cambios en anticuerpos anti belatacept y anti LEA29Y-T frente a concentraciones de belatacept.

30 Se perfilan programas de toma de muestras de sangre para PK e inmunogenicidad en la Tabla 35.

TABLA 35

Programa de Toma de Muestras Sanguíneas para Farmacocinética e Inmunogenicidad			
Día del Estudio	Tiempo (Relativo a la Dosificación) horas:minutos	PK	Inmunogenicidad
1	00.00 (predosis)	X	X ^a
	01:00	X	
	02:00	X	
	06:00	X	
	12:00	X	

35

(continuación)

Programa de Toma de Muestras Sanguíneas para Farmacocinética e Inmunogenicidad			
Día del Estudio	Tiempo (Relativo a la Dosificación) horas:minutos	PK	Inmunogenicidad
2	24:00	X	
	36:00	X	
3	48:00	X	
	60:00	X	
4	72:00	X	
	84:00	X	
5	96:00	X	
6	120:00	X	
7	144:00	X	
8	168:00	X	
14		X	X
21		X	
28		X	X
35		X	X
42		X	x
56		X	X

^a la muestra de inmunogenicidad (anticuerpos anti belatacept) del Día 1 debe extraerse antes de administrar el fármaco. Las muestras de los Días 28, 35, 42 y 56 pueden extraerse en un periodo de ± 2 días.

La Tabla 35 anterior enumera el programa de toma de muestras para seguir para la evaluación de la PK. Las muestras sanguíneas (~3 ml por muestra) se recogerán en un tubo Vacutainer® preetiquetado, de parte superior roja y gris (SST) mediante venopunción directa o de un conector salino. Si se usa un sistema de conector salino para recogida de sangre, deberían extraerse aproximadamente 0,5 ml de sangre a través del catéter interno y descartarse antes de obtener cada muestra de PK. Una vez que se ha obtenido la muestra de PK, se permite que la sangre coagule en el tubo Vacutainer® a temperatura ambiente durante 15-30 minutos. Después de la coagulación, la muestra debe centrifugarse durante 15 minutos a 1500 x g en un centrífuga refrigerada (4 °C). Cuando se complete la centrifugación, deberían retirarse al menos 0,5 ml de suero de cada punto temporal de muestra de PK mediante una pipeta y transferirse a un tubo de envío y almacenamiento de PK, preetiquetado, de tapón de rosca, de polipropileno. Debe usarse una pipeta limpia para tomar alícuotas de suero de cada punto temporal de la muestra. El tubo de polipropileno que contiene la muestra de suero de PK puede almacenarse congelado a -20 °C o más frío durante un máximo de un mes y después a -70 °C a continuación. El tiempo permitido desde la recogida de la muestra hasta la congelación del suero es de 12 horas. Se usará un procedimiento de inmunoensayo enzimático validado (EIA) sensible para medir las concentraciones de belatacept en suero.

La Tabla 35 enumera el programa de toma de muestras para seguir para la evaluación de la inmunogenicidad. Se obtendrán muestras de suero en visitas los Días 1, 14, 28, 35, 42 y 56. La muestra de inmunogenicidad del Día 1 (anti belatacept) debería tomarse antes de administrar el fármaco del estudio. Las muestras se ensayarán con respecto a la presencia de anticuerpos anti belatacept y anti LEA29Y-T. Para cada muestra de ensayo, se recogerá sangre (~3 ml por muestra) en un tubo Vacutainer® preetiquetado, de parte superior roja y gris (SST) mediante venopunción directa o de un conector salino (catéter interno). Si se usa un sistema de conector salino para recogida de sangre, deberían extraerse aproximadamente 0,5 ml de sangre a través del catéter interno y descartarse antes de obtener cada muestra de inmunogenicidad. Una vez que se ha obtenido la muestra de ensayo, se permitirá que la sangre coagule en el tubo Vacutainer® a temperatura ambiente durante 15-30 minutos. Después de la coagulación, la muestra debe centrifugarse durante 15 minutos a 1500 x g en un centrífuga refrigerada (4 °C). Cuando se complete la centrifugación, debería retirarse al menos 1 ml de suero mediante una pipeta y transferirse a un tubo de envío y almacenamiento de muestra de suero, preetiquetado, de tapón de rosca, de polipropileno. El tubo de polipropileno que contiene la muestra de suero debe almacenarse congelado a -20 °C o más frío. Se usarán dos procedimientos de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) validados, sensibles para medir los títulos de

anticuerpo para belatacept en suero. Un ensayo evalúa el título de anticuerpo para la molécula completa y el otro solamente para la parte LEA29Y-T.

Ejemplo XII

5 La desamidación, fragmentación y agregación son rutas de degradación observadas de moléculas LEA29YIg. Este protocolo perfila un estudio de estabilidad de pH a escala de laboratorio adicional diseñado para evaluar la formulación del producto farmacológico de belatacept SC en el intervalo de pH de 6,3- 7,5. El fin de este estudio es identificar la formulación de pH óptima que obtendrá un mínimo de 18 meses de periodo de caducidad para la formulación de belatacept SC.

10 Para este estudio, se formulará el producto de belatacept SC a pH 6,3, 6,6, 6,9, 7,2 y 7,5. La sustancia farmacológica de belatacept a ~25 mg/ml se concentrará en primer lugar a ~100 mg/ml, después de diafiltrará en tampón fosfato 10 mM a pH 6,9 seguido de una segunda concentración para obtener un intermedio del producto farmacológico (DPI) a >160 mg/ml. El DPI se formulará con sacarosa y poloxamer 188 y la concentración de lote final se ajustará con tampón de fosfato 10 mM (pH 6,9). El volumen formulado se subdividirá en cinco sublotos, como se perfila en el diseño del estudio. El pH de los sublotos se valorará hasta 6,3 y 6,6, respectivamente, usando HCl 1 N. El pH de los dos sublotos adicionales se valorará hasta 6,9, 7,2 y 7,5 con NaOH 1 N. Los lotes de producto se cargarán en Physiolis™ largo de 1 ml. Las muestras deberían protegerse de la luz en todo momento cubriéndolas o insertándolas en bolsas protectoras de la luz marrones. La formulación del producto farmacológico SC utilizada en este estudio se describe en la Tabla 36 a continuación.

TABLA 36

Composición de formulación del producto farmacológico SC a pH 6,9	
Ingrediente	Cantidad por 1,0 ml (mg)
Belatacept	125
Sacarosa	170
Poloxamer 188	8
Fosfato sódico monobásico, monohidrato	0,638
Fosfato sódico dibásico, anhídrido	0,475
Agua para Inyección	CS 1,0 ml

20 Se tomarán muestras del producto farmacológico almacenado a 2- 8 °C a los 0, 2, 4, 6, 12 18, 24 meses y opcionalmente 9 meses. Se tomarán muestras del producto farmacológico almacenado a 15 °C a los 1, 2, 4, 6 meses y opcionalmente 9 meses. Se tomarán muestras del producto farmacológico almacenado a 25 °C y 60% de humedad a los 1, 2, 4 y 6 meses. Se tomarán muestras del producto farmacológico a 35 °C a los 1, 2 y 4 meses. Las muestras almacenadas a 2-8 °C se ensayarán con respecto a apariencia (solamente muestras inicial y final), pH (solamente muestras inicial, de 4 meses y final), A280 (solamente muestras inicial, de 4 meses y final), HPLC de exclusión por tamaño, SDS-PAGE, mapeo peptídico por digestión trípica (TPM), Unión de Biacore B7 (solamente muestras inicial, de 4 meses y final o según se necesite) e isoelectroenfoque (IEF) (solamente muestras inicial y final). Las muestras almacenadas a 15 °C y 25 °C con 60% de humedad se ensayarán con respecto a A280 (solamente muestras inicial, de 4 meses y final), HPLC de exclusión por tamaño, SDS-PAGE y mapeo peptídico por digestión trípica (TPM). Las muestras almacenadas a 35 °C se ensayarán con respecto a HPLC de exclusión por tamaño, SDA- PAGE y mapeo peptídico por digestión trípica (TPM).

35 Se usarán procedimientos de ensayo no rutinarios para caracterizar adicionalmente las muestras de estabilidad en el punto temporal inicial, a los 4 meses, a los 12 meses y al final del estudio. Algunos de estos procedimientos también pueden usarse para ensayar muestras específicas si se observa una tendencia o un resultado inesperado. Los procedimientos no rutinarios incluyen: cromatografía de exclusión por tamaño que emplea dispersión de la luz multiángulo (SEC-MALS), unión cinética (SPR), Espectrometría de Masas, CD, AUC, Calorímetro de Exploración Diferencial (DSC), FFF, FTIR, HPLC de exclusión por tamaño (desnaturalizado) y SDS-PAGE (tinción con plata).

REIVINDICACIONES

1. Una formulación adecuada para administración subcutánea que comprende 125 mg/ml de moléculas CTLA4Ig ,un azúcar seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, lactosa, maltosa, manitol y trehalosa y mezclas de los mismos, y un vehículo acuoso farmacéuticamente aceptable, en la que la formulación tiene un intervalo de pH de 6 a 8 y una viscosidad de 9 a 20 mPa·s, y la relación en peso de azúcar:proteína es 1,1:1 o mayor.
2. La formulación de la reivindicación 1 en la que el azúcar es sacarosa, manitol o trehalosa.
3. La formulación de la reivindicación 1 en la que el azúcar es un disacárido.
4. La formulación de la reivindicación 1 en la que el azúcar es sacarosa.
5. La formulación de la reivindicación 4 en la que la relación en peso de sacarosa:proteína es de 1,3:1 a 1,5:1.
6. La formulación de la reivindicación 5 en la que la relación en peso de sacarosa:proteína es de aproximadamente 1,4:1.
7. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que tiene un intervalo de pH de 6 a 7,8.
8. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende además un agente tamponante farmacéuticamente aceptable.
9. La formulación de la reivindicación 8 en la que el agente tamponante está en una cantidad de tampón fosfato de al menos 10 mM.
10. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que comprende además un tensioactivo.
11. La formulación de la reivindicación 10 en la que el tensioactivo es Poloxamer 188 en una cantidad de aproximadamente 8 mg/ml.
12. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en la que la molécula CTLA4Ig tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 que comienza en metionina en la posición 27 o alanina en la posición 26 y termina en lisina en la posición 383 o glicina en la posición 382.
13. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que comprende las moléculas CTLA4Ig en una cantidad de aproximadamente 125 mg/ml, sacarosa en una cantidad de aproximadamente 170 mg/ml, al menos un agente tamponante, agua estéril para inyección y opcionalmente un tensioactivo, en la que la molécula CTLA4Ig tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 que comienza en metionina en la posición 27 o alanina en la posición 26 y que termina en lisina en la posición 383 o glicina en la posición 382.
14. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en la que la formulación es estable cuando se almacena de 2 a 8 °C durante al menos 12 meses.
15. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en la que la formulación tiene una osmolalidad de 700 mOsm/kg de H₂O a 800 mOsm/kg de H₂O.
16. Un artículo de fabricación que comprende;
 - a) al menos un recipiente que contiene la formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y
 - b) instrucciones para administrar la formulación por vía subcutánea a un sujeto en necesidad de la misma.
17. El artículo de fabricación de la reivindicación 16 en el que el recipiente es un vial o jeringa.
18. Una formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para su uso en el tratamiento de enfermedades del sistema inmunitario.
19. La formulación de acuerdo con la reivindicación 18 para su uso en la terapia de enfermedades del sistema inmunitario de acuerdo con la reivindicación 18 en la que las enfermedades del sistema inmunitario se seleccionan del grupo que consiste en enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inmunoproliferativas y trastornos relacionados con injertos.
20. Una formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedad de injerto contra huésped, artritis reumatoide o inhibición de rechazos de trasplantes de órganos y/o tejido sólidos.

FIG. 1A

1 AGCTTCACCA ATG GGT GTA CTG CTC ACA CAG AGG ACG CTG
M G V L L T Q R T L
↳ Secuencia señal de oncostatina M →

41 CTC AGT CTG GTC CTT GCA CTC CTG TTT CCA AGC ATG GCG
L S L V L A L L F P S M A

80 AGC ATG GCA ATG CAC GTG GCC CAG CCT GCT GTG GTA CTG
S M A M H V A Q P A V V L
↳ CTLA4 humano →

119 GCC AGC AGC CGA GGC ATC GCC AGC TTT GTG TGT GAG TAT
A S S R G I A S F V C E Y

158 GCA TCT CCA GGC AAA GCC ACT GAG GTC CGG GTG ACA GTG
A S P G K A T E V R V T V

197 CTT CGG CAG GCT GAC AGC CAG GTG ACT GAA GTC TGT GCG
L R Q A D S Q V T E V C A

236 GCA ACC TAC ATG ATG GGG AAT GAG TTG ACC TTC CTA GAT
A T Y M M G N E L T F L D

275 GAT TCC ATC TGC ACG GGC ACC TCC AGT GGA AAT CAA GTG
D S I C T G T S S G N Q V

314 AAC CTC ACT ATC CAA GGA CTG AGG GCC ATG GAC ACG GGA
N L T I Q G L R A M D T G

353 CTC TAC ATC TGC AAG GTG GAG CTC ATG TAC CCA CCG CCA
L Y I C K V E L M Y P P P

392 TAC TAC CTG GGC ATA GGC AAC GGA ACC CAG ATT TAT GTA
Y Y L G I G N G T Q I Y V

431 ATT GAT CCA GAA CCG TGC CCA GAT TCT GAT CAG GAG CCC
I D P E P C P D S D Q E P
↳

470 AAA TCT TCT GAC AAA ACT CAC ACA TCC CCA CCG TCC CCA
K S S* D K T H T S* P P S* P
↳ Bisagra de IgG₁ humana →

509 GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA TCG TCA GTC TTC CTC TTC
A P E L L G G S* S V F L F
↳ Dominio CH2 de IgG₁ humana →

548 CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CCG ACC
P P K P K D T L M I S R T

FIG. 1B

587 CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA
P E V T C V V V D V S H E

626 GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG
D P E V K F N W Y V D G V

665 GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG
E V H N A K T K P R E E Q

704 TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC
Y N S T Y R V V S V L T V

743 CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC
L H Q D W L N G K E Y K C

782 AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA
K V S N K A L P A P I E K

821 ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG
T I S K A K G O P R E P Q
↳ Dominio C_H3 de IgG₁ humana →

860 GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG
V Y T L P P S R D E L T K

899 AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT
N Q V S L T C L V K G F Y

938 CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG
P S D I A V E W E S N G Q

977 CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC
P E N N Y K T T P P V L D

1016 TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG
S D G S F F L Y S K L T V

1055 GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC
D K S R W Q Q G N V F S C

1094 TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG
S V M H E A L H N H Y T Q

1133 AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA GTGCGACG
K S L S L S P G K

1172 GCCGCAAGC CCCGCTCCC GGGCTCTCGC GGTCGCAC GAGGATGCTT
1222 CTAGA

FIG. 2

ATGGGTGTACTGCTCACACAGGGAAGCTGCTCAGTCTGGTCTTGCCTGCACTCCTGTTC	-19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--F--	-7
AGCATGGGAGCATGGCAATGCACGTGGCCAGCCTGCTGTGTACTGGCCAGCAGCCGA	+42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--F--A--V--V--L--A--S--S--R--	+14
+1	
GGCATCCCTAGCTTTGTGTGTGATATGCATCTCCAGGCCAATATACTGAGGTCCGGGTG	+102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--F--G--K--Y--T--E--V--R--V--	+34
ACAGTGCCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAAGTCTGTGGGCAACCTACATGATG	+162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--	+54
GGCAATGAGTGTGACCTTCCDAGATGATTCCATCTGCAACGGGCACTCCAGTGGAAATCAA	+222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--H--Q--	+74
GTGAACCTCACTATCCAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--	+94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA	+342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--	+114
ATTGATCCAGAACCCTGCCCAGATTTCTGATCAGGAGCCCAATCTTCTGACAAAACCTCAC	+402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--	+134
ACATCCCCACCGTCCCAGCACCTGAACTCTGGGGGATGCTCAGTCTTCTCTCCCC	+462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--	+154
CCAAACCCAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTG	+522
P--K--E--D--T--L--M--I--S--R--T--E--E--V--T--C--V--V--V--	+174
GACGTGAGCCACGAAGACCCGAGGTCAAGTTCAACTGTTACGTGGACCGCGTGGAGGTG	+582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--	+194
CATAATGCCAGACARAGCCCGGGAGGAGCAGTACACAGCACGTTACCGTGTGGTCAGC	+642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--	+214
GTCTCAACCGTCTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGSCAAGGATGACAGTGCRAAGTCTCC	+702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--	+234
AACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAACCACTCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA	+762
N--K--A--L--P--A--P--L--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--	+254
GAACCAAGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAAC	+822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--E--D--E--L--T--K--H--Q--V--S--	+274
CTGACCTGCTGCTCAAGGCTTCTATCCAGGACATCCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT	+882
L--T--C--L--V--K--G--P--Y--F--S--D--I--A--V--E--W--E--S--R--	+294
GGGACCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC	+942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--	+314
TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAGAGCAGGTGGCAGCGGGGAACGTCTTCTCA	+1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--H--V--F--S--	+334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACACCACTACACGAGAGAGCCCTCTCCCTGTCT	+1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--I--S--L--S--	+354
CCGGTAAATGA	
P--G--K--*	