

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 862**

51 Int. Cl.:

A61K 38/19 (2006.01)

C07K 14/535 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2011** **E 11764063 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015** **EP 2618830**

54 Título: **Formulaciones para el factor estimulante de colonias de granulocitos bovino y sus variantes**

30 Prioridad:

23.09.2010 US 385629 P

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

14.07.2015

73 Titular/es:

ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US

72 Inventor/es:

DAVAGNINO, JUAN;
KHA, CATHERINE, NGAN y
KLOTZ, ALAN VOSKAMP

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 540 862 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 para el factor estimulante de colonias de granulocitos bovino y sus variantes

El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es un miembro de la familia supergenética de hormonas de crecimiento. El G-CSF estimula la proliferación de células precursoras de la médula ósea y su diferenciación en granulocitos. Además el G-CSF es un estímulo potente para la proliferación y maduración de neutrófilos in vivo (Cohen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 1987; 84: 2484-2488; véase también Heidari y col., Vet. Immunol. Immunopathol. 2001; 81:45-57). El G-CSF también es capaz de inducir la activación funcional o "estimulación" de neutrófilos maduros in vitro (Weisbart, R. H. y col., Annals of Internal Medicine 1989; 110:297-303). Se ha demostrado que el G-CSF estimula los granulocitos humanos y aumenta la liberación de superóxido estimulada por el péptido quimiotáctico N-formil-metionil-fenilalanina (S. Kitagawa, y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987; 144:1143-1146, y C. F. Nathan, Blood 1989; 74:301-306), y activa la fagocitosis mediada por IgA en los neutrófilos humanos (Weisbart, R. H., y col., Nature 1988; 332: 647-649).

Se ha encontrado que el G-CSF es útil en el tratamiento de indicaciones en las que el aumento de neutrófilos produce un beneficio. El G-CSF también es útil solo, o en combinación con otros compuestos (tales como otras citoquinas) para el crecimiento o expansión de células en cultivo, por ejemplo, para trasplantes de médula ósea.

Se ha descrito la clonación de ADNc y la expresión de G-CSF recombinante humano (hG-CSF), y el hG-CSF recombinante muestra la mayoría, si no todas, las propiedades biológicas de la molécula nativa (Souza, L. y col., Science 232, 61-65 (1986)). El análisis de la secuencia de los clones de ADNc y ADN genómico ha permitido la deducción de la secuencia de aminoácidos y revela que la proteína tiene 204 aminoácidos de longitud con una secuencia de señal de 30 aminoácidos. La proteína madura tiene 174 aminoácidos de longitud y no posee sitios potenciales de glucosilación unida a N sino varios sitios posibles para glucosilación unida a O.

Se conocen en la técnica preparaciones farmacéuticas que contienen hG-CSF e incluyen numerosas formulaciones. Por ejemplo, se describen varias formulaciones de hG-CSF, de Piedmonte y col., Advanced Drug Delivery Reviews, 60: 50-58 (2008), Herman y col., en Formulation, Characterization, and Stability of Protein Drugs, Rodney Pearlman and Y. John Wang, eds., Plenum Press, New York (1996), Patente de EE. UU. Nº 5.919.757 de Michaelis y col., y la Patente de EE. UU. Nº 6.908.610 de Sato y col. Tradicionalmente, se incluyen tensioactivos en las formulaciones de hG-CSF y pueden proteger el hG-CSF en superficies de contacto potencialmente desestabilizantes, contra superficies que se ponen en contacto durante el proceso, y contra la alteración de su estabilidad conformacional.

También se ha descrito la clonación del ADNc y la expresión del G-CSF recombinante bovino (bG-CSF). Por ejemplo, el polinucleótido y la secuencia de polinucleótido del bG-CSF maduro se presentan en la Patente de EE. UU. Nº 5.849.883, que también describe los procedimientos para clonar, aislar y purificar el polipéptido y los análogos del mismo. El bG-CSF maduro tiene 174 aminoácidos de longitud y tienen una homología del 82% con el hG-CSF. Heidari y col., *supra*, describen la expresión, purificación, y actividades biológicas de bG-CSF.

La administración de bG-CSF al ganado bovino proporciona beneficios terapéuticos. En consecuencia, una formulación farmacéutica que contenga bG-CSF es deseable para utilizar su potencial terapéutico. Sin embargo, las formulaciones farmacéuticas de bG-CSF que se desarrollan según los procedimientos tradicionales conocidos en la técnica dan como resultado propiedades del producto indeseables, tales como agregación y desestabilización del polipéptido bG-CSF y/o la formulación.

Por lo tanto, existe una necesidad de una formulación farmacéutica de bG-CSF estable con propiedades deseables, tales como propiedades de mínima agregación del producto y desestabilización. En consecuencia, la presente divulgación proporciona formulaciones farmacéuticas acuosas adecuadas con un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo que muestran propiedades deseables y también proporciona ventajas relacionadas.

La presente invención se define en las reivindicaciones.

La presente divulgación proporciona formulaciones acuosas estables que comprenden un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo, una sustancia tampón, y un excipiente, en que dicha formulación está sustancialmente libre de monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20). La divulgación también proporciona procedimientos de utilización, una forma liofilizada o en polvo, y los procesos para preparar la formulación.

Las formulaciones acuosas estables del factor estimulante de colonias de granulocitos bovinos ("bG-CSF") contienen un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo. Como se utiliza en el presente documento "polipéptido G-CSF bovino" (de manera alternativa denominado "polipéptido bG-CSF", "G-CSF bovino", o "bG-CSF") y variantes del mismo incluirán los polipéptidos y proteínas que tienen al menos una actividad biológica de un CSF, análogos de bG-CSF, bG-CSF mutantes, bG-CSF glucosilados alterados, bG-CSF conjugado con PEG, isoformas de bG-CSF, miméticos de bG-CSF, fragmentos de bG-CSF, proteínas híbridas de bG-CSF, proteínas de fusión, oligómeros y multímeros, homólogos, variantes del patrón de glucosilación, variantes de corte y empalme, y muteínas, de los mismos, independientemente de la actividad biológica de los mismos, e independientemente además del procedimiento de síntesis o fabricación de los mismos incluyendo pero sin limitarse a, recombinante (sea producido a partir de ADNc, ADN genómico, ADN sintético u otra forma de ácido nucleico), in vitro, in vivo, por microinyección

de moléculas de ácido nucleico, sintético, transgénico, y procedimientos de gen activado. Adicionalmente, la expresión polipéptido bG-CSF o una variante del mismo engloba polipéptidos bG-CSF que comprenden una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos. Véase la Patente de EE. UU. N° 5.849.883 para más ejemplos de análogos de G-CSF bovino. La secuencia del polipéptido bG-CSF maduro que tiene 174 aminoácidos de longitud es la siguiente:

5 TPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLCAAHK
LCHPEELMLLRHSLGIPQAPLSSCSSQSLQLTSCNLQLHGG
LFLYQGLLQALAGISPELAPTLDTLQLDVTDFATNIWLQM
EDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQLHRF

10 LELAYRGLRYLAEP

Además, el polipéptido bG-CSF con un aminoácido inicial metionina es el siguiente:

15 MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLCAAH
KLCHPEELMLLRHSLGIPQAPLSSCSSQSLQLTSCNLQLHG
GLFLYQGLLQALAGISPELAPTLDTLQLDVTDFATNIWLQ
MEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQLHR

FLELAYRGLRYLAEP

Se han descrito sustituciones en una amplia variedad de posiciones de aminoácidos en el bG-CSF. Las sustituciones incluyen pero no se limitan a las que modulan la estabilidad farmacéutica, aumentan la actividad agonista, aumentan la resistencia a proteasas, convierten el polipéptido en antagonista, etc., se engloban en la expresión polipéptido bG-CSF o una variante del mismo.

La expresión polipéptido bG-CSF o una variante del mismo también incluye el bG-CSF glucosilado, tal como pero no limitado a polipéptidos glucosilados en cualquier posición de aminoácido, formas del polipéptido glucosilado unido a N, o formas del polipéptido glucosilado unido a O. Las variantes que contienen cambios únicos de nucleótidos también se consideran como variantes biológicamente activas del polipéptido bG-CSF. Las variantes que contienen cambios de nucleótidos únicos también se consideran como variantes biológicamente activas del bG-CSF. Además, también se incluyen variantes de corte y empalme. La expresión polipéptido bG-CSF o una variante del mismo también incluye heterodímeros bG-CSF, homodímeros, heteromultímeros, u homomultímeros de uno cualquiera o más de los bG-CSF o cualquier otro péptido, proteína, carbohidrato, polímero, molécula pequeña, engarce, ligando u otra molécula activa de cualquier tipo, unido por medios químicos o que se expresa como una proteína de fusión (véase, por ejemplo, las Pat. de EE. UU. N°s 6.261.550; 6.166.183; 6.204.247; 6.261.550; y 6.017.876), así como los análogos de polipéptido que contienen, por ejemplo, eliminaciones específicas u otras modificaciones que mantengan la actividad biológica (véase, por ejemplo, las Pat. de EE. UU. N°s 6.261.550; 6.004.548; y 6.632.426). Los polipéptidos bG-CSF y las variantes de los mismos se describen por ejemplo en la solicitud de Patente de EE. UU. 12/507.237 (actualmente Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. 2010/0035812). En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados no naturalmente en una o más de las siguientes posiciones en bG-CSF: 8, 62, 69, 125, 133, 136, y cualquier combinación de los mismos (en el polipéptido bG-CSF maduro o los correspondientes aminoácidos en el polipéptido bG-CSF con un resto de aminoácido inicial de metionina). En algunas realizaciones, se sustituye el aminoácido codificado no naturalmente acetilfenilalanina (pAF) por el aminoácido codificado naturalmente en una de las siguientes posiciones: S8, S62, L69, G125, T133, A136, y cualquier combinación de las mismas (en el polipéptido bG-CSF maduro o los correspondientes aminoácidos en el polipéptido bG-CSF con un resto de aminoácidos inicial de metionina).

En otra realización, el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo es bG-CSF-S8pAF, que tiene la secuencia:

45 MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLCAAH
KLCHPEELMLLRHSLGIPQAPLSSCSSQSLQLTSCNLQLHG
GLFLYQGLLQALAGISPELAPTLDTLQLDVTDFATNIWLQ
MEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQLHR
FLELAYRGLRYLAEP

en el que se hace una sustitución única de para-acetilfenilalanina (pAF) en la posición S8.

En una realización, el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo es bG-CSF-S62pAF, que tiene una secuencia:

50 MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRK1QADGAELQERLCAAH
KLCHPEELMLLRHSLGIPQAPLSSCSSQSLQLTSCNLQLHG
GLFLYQGLLQALAGISPELAPTLDTLQLDVTDFATNIWLQ
MEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQLHR

FLELAYRGLRYLAEP

en la que se hace una única sustitución de para-acetilfenilalanina (pAF) en la posición S62.

En una realización, el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo es bG-CSF-L69pAF, que tiene la secuencia:

MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIADGAELQERLCAAH

5 KLCHPEELMLLRHSLGIPQAPLSSCSSQSLQTSCLNQLHG

GLFLYQGLLQALAGISPELAPTLDTLQLDVTDFATNIWLQ

MEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQLHR

FLELAYRGLRYLAEP

en la que se hace una única sustitución de para-acetilfenilalanina (pAF) en la posición L69.

10 En una realización, el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo es bG-CSF-G125pAF, que tiene la secuencia:

MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIADGAELQERLCAAH

KLCHPEELMLLRHSLGIPQAPLSSCSSQSLQTSCLNQLHG

GLFLYQGLLQALAGISPELAPTLDTLQLDVTDFATNIWLQ

MEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQLHR

15 FLELAYRGLRYLAEP

en la que se hace una única sustitución de para-acetilfenilalanina (pAF) en la posición G125.

En una realización, el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo es bG-CSF-T133pAF, que tiene la secuencia:

MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIADGAELQERLCAAH

KLCHPEELMLLRHSLGIPQAPLSSCSSQSLQTSCLNQLHG

20 GLFLYQGLLQALAGISPELAPTLDTLQLDVTDFATNIWLQ

MEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQLHR

FLELAYRGLRYLAEP

en la que se hace una única sustitución de para-acetilfenilalanina (pAF) en la posición T133.

En una realización, el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo es bG-CSF-A136pAF, que tiene la secuencia:

25 MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIADGAELQERLCAAH

KLCHPEELMLLRHSLGIPQAPLSSCSSQSLQTSCLNQLHG

GLFLYQGLLQALAGISPELAPTLDTLQLDVTDFATNIWLQ

MEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQLHR

FLELAYRGLRYLAEP

30 en la que se hace una única sustitución de para-acetilfenilalanina (pAF) en la posición A136.

La formulación puede incluir un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo que se une a un engarce, un polímero, o una molécula biológicamente activa. Los engarces, polímeros, y moléculas biológicamente activas se describen en la Solicitud de Patente de EE. UU. 12/507.237 (actualmente Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. 2010/0035812). El término "enlace" o "engarce" se utiliza en el presente documento para referirse a grupos o enlaces que se forman normalmente como resultado de una reacción química y típicamente son enlaces covalentes. Enlaces hidrolíticamente estables significa que los enlaces son sustancialmente estables en agua y no reaccionan con el agua a valores de pH útiles, incluyendo, pero sin limitación, bajo condiciones fisiológicas durante un extenso periodo de tiempo, incluso indefinidamente. Enlaces hidrolíticamente inestables o degradables significa que los enlaces son degradables en agua o en soluciones acuosas, que incluyen, por ejemplo, la sangre. Enlaces enzimáticamente inestables o degradables significa que los enlaces se pueden degradar por una o más enzimas. Como se entiende en la técnica, el PEG y los polímeros relacionados pueden incluir enlaces degradables en el

armazón del polímero o en el grupo engarce entre el armazón del polímero y uno o más de los grupos terminales de la molécula de polímero. Por ejemplo, los enlaces éster formados por la reacción de ácidos carboxílicos de PEG o ácidos carboxílicos activados de PEG con grupos alcohol en un agente biológicamente activo generalmente se hidrolizan bajo condiciones fisiológicas para liberar el agente. Otros enlaces hidrolíticamente degradables incluyen, pero no se limitan a, enlaces carbonato; enlaces imina que resultan de la reacción de una amina y un aldehído; enlaces éster fosfato formados por la reacción de un alcohol con un grupo fosfato; enlaces hidrazona que son el producto de reacción de una hidrazida y un aldehído; enlaces acetal que son el producto de reacción de un aldehído y un alcohol; enlaces ortoéster que son el producto de reacción de un formiato y un alcohol; enlaces peptídicos formados por un grupo amina, que incluye pero sin limitación, al del extremo de un polímero tal como el PEG, y un grupo carboxilo de un péptido; y enlaces de oligonucleótidos formados por un grupo fosforamida, incluyendo pero sin limitación, al del extremo del polímero, y un grupo hidroxilo 5' de un oligonucleótido.

En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo se une a un polímero hidrosoluble. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "polímero hidrosoluble" se refiere a cualquier polímero que es soluble en disolventes acuosos. El enlace de polímeros hidrosolubles a un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo puede dar como resultado cambios que incluyen, pero no se limitan al aumento o modulación de la semivida en el suero, aumento o modulación de la semivida terapéutica con respecto a su forma sin modificar, modulación de la inmunogenicidad, modulación de las características físicas de asociación tales como agregación y formación de multímeros, unión alterada al receptor, unión alterada a una o más parejas de unión, y dimerización o multimerización alterada del receptor. El polímero hidrosoluble puede tener o no su propia actividad biológica, y se puede utilizar como un engarce para unir el bG-CSF a otras sustancias, incluyendo pero sin limitarse a uno o más polipéptidos bG-CSF o variantes de los mismos, o una o más moléculas biológicamente activas. Los polímeros adecuados incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol, polietilenglicol propionaldehído, derivados mono alcoxi o ariloxi C1-C10 de los mismos (descrito en la Pat. de EE. UU. N° 5.252.714), monometoxi-polietilenglicol, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, poliaminoácidos, diviniléter de anhídrido maleico, N-(2-Hidroxipropil)-metacrilamida, dextrano, derivados del dextrano incluyendo sulfato de dextrano, polipropilenglicol, copolímero óxido de polipropileno/óxido de etileno, poliol polioxiethylado, heparina, fragmentos de heparina, polisacáridos, oligosacáridos, glucanos, celulosa y derivados de celulosa, incluyendo pero sin limitarse a metilcelulosa y carboximetilcelulosa, almidón y derivados de almidón, polipéptidos, polialquilenglicol y derivados de los mismos, copolímeros de polialquilenglicoles y derivados de los mismos, éteres de etil polivinilo, y alfa-beta-poli[(2-hidroxietil)-DL-aspartamida, y similares, o mezclas de los mismos. Ejemplos de tales polímeros hidrosolubles incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol y albúmina sérica. Los documentos WO 03/074087 y WO 03/074088 describen la conjugación de proteínas o moléculas pequeñas de hidroxialquil almidón (HAS). Ejemplos de hidroxialquil almidones, incluyen pero no se limitan a hidroxietil almidón. Los conjugados de hidroxialquil almidón y otra molécula, por ejemplo, pueden comprender un enlace covalente entre grupos aldehído terminales del HAS y grupos reactivos de la otra molécula.

En algunas realizaciones, el polímero hidrosoluble es un resto poli(etilenglicol). En algunas realizaciones, el resto poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 100 kDa. En otra realización, el polímero hidrosoluble tiene un peso molecular de entre aproximadamente 0,1 kDa a aproximadamente 50 kDa. En algunas realizaciones el polímero hidrosoluble tiene un peso molecular de entre aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 30 kDa. En otra realización, el polímero hidrosoluble tiene un peso molecular de entre aproximadamente 15 kDa a aproximadamente 25 kDa. En otra realización más, el polímero hidrosoluble tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa. Un experto en la técnica entendería que un polímero hidrosoluble con un peso de "aproximadamente 20 kDa" incluye una variación del peso molecular de aproximadamente un 15% (es decir, desde aproximadamente 17 kDa a aproximadamente 23 kDa) basándose en la especificación y polidispersión del resto.

En una realización el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo es bG-CSF-S8pAF, que tiene la secuencia:

```
MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLCAAH
KLCHPEELMLLRHSLGIPQAPLSSCSSQSLQLTSCLNQLHG
GLFLYQGLLQALAGISPELAPTLDTLQLDVTDFATNIWLQ
MEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQLHR
FLELAYRGLRYLAEP
```

en la que se hace una única sustitución de para-acetilfenilalanina (pAF) en la posición S8 y se une a un resto de poli(etilenglicol). Por ejemplo, si el resto de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa, el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo en esta realización podría identificarse como "bG-CSF-S8pAF-20K PEG", que indica que un resto de poli(etilenglicol) de 20 kDa se une a la sustitución pAF que se ha hecho en la posición S8.

En una realización el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo es bG-CSF-S62pAF, que tiene la secuencia:

```
MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLCAAH
```

KLCHPEELMLLRHSLGIPQAPLSSCSSQSLQLTSCNLQLHG
GLFLYQGLLQALAGISPELAPTLDTLQLDVTDFATNIWLQ
MEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQLHR
FLELAYRGLRYLAEP

5 en la que se hace una única sustitución de para-acetilfenilalanina (pAF) en la posición S62 y se une a un resto de poli(etilenglicol). Por ejemplo, si el resto de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa, el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo en esta realización podría identificarse como "bG-CSF-S62pAF-20K PEG", que indica que un resto de poli(etilenglicol) de 20 kDa se une a la sustitución pAF que se ha hecho en la posición S62.

10 En una realización el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo es bG-CSF-L69pAF, que tiene la secuencia:

MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIADGAELQERLCAAH
KLCHPEELMLLRHSLGIPQAPLSSCSSQSLQLTSCNLQLHG
GLFLYQGLLQALAGISPELAPTLDTLQLDVTDFATNIWLQ
MEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQLHR

15 FLELAYRGLRYLAEP

en la que se hace una única sustitución de para-acetilfenilalanina (pAF) en la posición L69 y se une a un resto de poli(etilenglicol). Por ejemplo, si el resto de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa, el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo en esta realización podría identificarse como "bG-CSF-L69pAF-20K PEG", que indica que un resto de poli(etilenglicol) de 20 kDa se une a la sustitución pAF que se ha hecho en la posición L69.

20 En una realización el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo es bG-CSF-G125pAF, que tiene la secuencia:

MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIADGAELQERLCAAH
KLCHPEELMLLRHSLGIPQAPLSSCSSQSLQLTSCNLQLHG
GLFLYQGLLQALAGISPELAPTLDTLQLDVTDFATNIWLQ
MEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQLHR

25 FLELAYRGLRYLAEP

en la que se hace una única sustitución de para-acetilfenilalanina (pAF) en la posición G125 y se une a un resto de poli(etilenglicol). Por ejemplo, si el resto de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa, el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo en esta realización podría identificarse como "bG-CSF-G125pAF-20K PEG", que indica que un resto de poli(etilenglicol) de 20 kDa se une a la sustitución pAF que se ha hecho en la posición G125.

30 En una realización el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo es bG-CSF-T133pAF, que tiene la secuencia:

MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIADGAELQERLCAAH
KLCHPEELMLLRHSLGIPQAPLSSCSSQSLQLTSCNLQLHG
GLFLYQGLLQALAGISPELAPTLDTLQLDVTDFATNIWLQ
MEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQLHR

35 FLELAYRGLRYLAEP

en la que se hace una única sustitución de para-acetilfenilalanina (pAF) en la posición T133 y se une a un resto de poli(etilenglicol). Por ejemplo, si el resto de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa, el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo en esta realización podría identificarse como "bG-CSF-T133pAF-20K PEG", que indica que un resto de poli(etilenglicol) de 20 kDa se une a la sustitución pAF que se ha hecho en la posición T133.

40 En una realización el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo es bG-CSF-A 136pAF, que tiene la secuencia:

MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIADGAELQERLCAAH

KLCHPEELMLLRHSLGIPQAPLSSCSSQLQLTSCNLQHLHG

GLFLYQGLLQALAGISPELAPTLDTLQLDVTDFATNIWLQ

MEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQLHR

FLELAYRGLRYLAEP

5 en la que se hace una única sustitución de para-acetilfenilalanina (pAF) en la posición A 136 y se une a un resto de poli(etilenglicol). Por ejemplo, si el resto de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa, el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo en esta realización podría identificarse como "bG-CSF-A 136pAF-20K PEG", que indica que un resto de poli(etilenglicol) de 20 kDa se une a la sustitución pAF que se ha hecho en la posición A 136.

10 Como se utiliza en el presente documento, los términos "estabilidad" y "estable" en el contexto de una formulación que comprende un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo se refiere al desplegamiento, agregación, degradación, desnaturalización, fragmentación, o desestabilización térmicos y químicos del péptido bG-CSF o una variante del mismo bajo determinadas condiciones de fabricación, preparación, transporte y almacenamiento. Las formulaciones "estables" mantienen la estabilidad estructural, lo que da como resultado en la retención de la actividad biológica, deseablemente más del 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99,5% en condiciones de fabricación, preparación transporte y almacenamiento. La estabilidad de las formulaciones se puede evaluar por el grado de agregación, despegilación, degradación, desnaturalización, o fragmentación por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica y descritos además en el presente documento.

20 Como se utiliza en el presente documento, el término "acuoso" en el contexto de una formulación que comprende un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo se refiere al agua, uno o más disolventes orgánicos hidrosolubles, o una mezcla de los mismos. La expresión "disolvente orgánico" se utiliza en el presente documento en su sentido convencional y se refiere a un compuesto orgánico líquido, típicamente un material orgánico monomérico en forma de líquido, preferentemente un líquido relativamente no viscoso, cuya estructura molecular contiene átomos de hidrógeno, átomos de carbono, y opcionalmente también otros átomos, y que es capaz de disolver sólidos, gases o líquidos.

Las formulaciones farmacéuticas pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la particular composición que se va a administrar, así como por el procedimiento particular utilizado para administrar la composición (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed. 1985)). Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen pero no se limitan a sustancias tampón y excipientes, tales como los que contienen, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol, y/o combinaciones de los mismos. Los vehículos adecuados pueden ser sustancias tampón que contienen succinato, fosfato, borato, HEPES, citrato, histidina, imidazol, acetato, bicarbonato, y otros ácidos orgánicos. Los vehículos adecuados pueden ser excipientes que contienen alcoholes azúcar polihídricos, aminoácidos tales como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, leucina, fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc., azúcares orgánicos o alcoholes azúcar, tales como lactosa, trehalosa, estaquiosa, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinisol, galactitol, glicerol y similares, incluyendo ciclitoles tales como el inositol; polietilenglicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato sódico, tioglicerol, α -monotioglicerol y tiosulfato sódico; polipéptidos de bajo peso molecular (es decir < 10 restos); proteínas tales como albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; monosacáridos tales como xilosa, manosa, fructosa y glucosa; disacáridos tales como la lactosa, maltosa y sacarosa; trisacáridos tales como la rafinosa, y polisacáridos tales como el dextrano.

Se pueden utilizar citrato, histidina, maleato, succinato, fosfato, o una combinación de los mismos como sustancias tampón. En algunas realizaciones, se utiliza el citrato o succinato como sustancia tampón en las formulaciones acuosas estables. En algunas realizaciones, la sustancia tampón tiene una molaridad entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En una realización la sustancia tampón tiene una molaridad de aproximadamente 30 mM. Las sustancias tampón se pueden presentar en forma del ácido libre correspondiente o en forma de sales alcalinas, alcalinotérricas o de amonio. La formulación puede contener además sustancias farmacéuticas auxiliares comunes. La secuencia de adición de varias sustancias auxiliares o del principio activo durante la producción de las formulaciones farmacéuticas líquidas es bastante independiente del efecto estabilizante en el almacenamiento y es a discreción del experto en la técnica.

Se pueden utilizar cloruro sódico, trehalosa, sorbitol, arginina, o una combinación de los mismos como excipientes. En una realización, el excipiente es la arginina. En algunas realizaciones, la arginina tiene una molaridad entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 500 mM. En otras realizaciones, la arginina tiene una molaridad de aproximadamente 200 a aproximadamente 300 mM. En algunas realizaciones, la arginina tiene una molaridad de aproximadamente 250 mM.

Tradicionalmente, las formulaciones farmacéuticas de proteínas incluyen tensioactivos. La inclusión de tensioactivos puede proteger las proteínas en las superficies de contacto potencialmente desestabilizantes, contra superficies que

se ponen en contacto durante el procesamiento, y contra la alteración de su estabilización conformacional termodinámica. Los tensioactivos se conocen bien en la técnica, por ejemplo, los tensioactivos de polisorbato. Un ejemplo de un tensioactivo polisorbato es el monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20), también conocido por el nombre comercial Tween 20®. Sin embargo, estudios de una formulación bG-CSF que contenía niveles traza de monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20) indicaban que los agregados aumentaban hasta un 3,2% (según se medía por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)) tras 5 días de incubación a 25 °C. Por lo tanto, las formulaciones están sustancialmente libres de un surfactante, surfactantes polisorbato, y/o monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20). Como se utiliza en el presente documento, la expresión “sustancialmente libre” de un surfactante, surfactantes polisorbato, y/o monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20) se refiere a una formulación que contiene menos del 0,033%, menos del 0,001%, menos del 0,0005%, menos del 0,0003%, o menos del 0,0001% de surfactante, surfactantes polisorbato, y/o monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20) con el fin de conseguir una formulación estable con propiedades deseables, tales como mínima agregación del producto y mínima desestabilización, y, si es aplicable, reducción de la despegilación.

La expresión “molécula biológicamente activa” como se utiliza en el presente documento significa cualquier sustancia que puede afectar cualquiera de las propiedades físicas o bioquímicas de un sistema biológico, ruta, molécula, o interacción en relación a un organismo, incluyendo pero sin limitarse a, virus, bacterias, bacteriófago, transposón, prión, insectos, hongos, plantas, animales y seres humanos. En particular, como se utiliza en el presente documento, las moléculas biológicamente activas incluyen, pero no se limitan a cualquier sustancia que se quiera utilizar en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de enfermedades en seres humanos u otros animales, o de otra manera mejorar el bienestar físico o mental de seres humanos o animales. Ejemplos de moléculas biológicamente activas incluyen, pero no se limitan a péptidos, proteínas, enzimas, fármacos de molécula pequeña, vacunas, inmunógenos, drogas duras, drogas blandas, carbohidratos, átomos o moléculas inorgánicas, colorantes, lípidos, nucleósidos, radionúclidos, oligonucleótidos, toxoides, toxinas, células procariotas y eucariotas, virus, polisacáridos, ácidos nucleicos y partes de los mismos que se obtienen o derivan de virus, bacterias, insectos, animales o cualquier otra célula o tipo celular, liposomas, micropartículas y micelas.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen las que opcionalmente contienen también uno o más de otros principios activos, además del polipéptido bG-CSF o una variante del mismo. Como se utiliza en el presente documento, la expresión “principio activo” o “ingrediente terapéutico” se refiere a un compuesto terapéuticamente activo, así como cualquier profármaco del mismo y sales, hidratos y solvatos farmacéuticamente aceptables del compuesto y los profármacos. Otros principios activos se pueden combinar con polipéptido bG-CSF o una variante del mismo y se puede administrar o por separado o en la misma formulación farmacéutica. La cantidad de los otros principios activos que se van a administrar se determinará fácilmente por un experto en la técnica basándose en la terapia con bG-CSF.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen las que contienen opcionalmente uno o más de otros principios inactivos, además del polipéptido bG-CSF o una variante del mismo. Como se utiliza en el presente documento “principio inactivo” se refiere a un compuesto terapéuticamente inactivo así como a cualquier profármaco del mismo, y sales, hidratos y solvatos farmacéuticamente aceptable del compuesto y los profármacos. Se pueden combinar otros ingredientes inactivos con el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo y se pueden administrar o por separado o en la misma formulación farmacéutica. La cantidad de otros principios activos para administrarse pueden determinarlos fácilmente un experto en la técnica basándose en la terapia con bG-CSF.

La cantidad de polipéptido bG-CSF o una variante del mismo en las formulaciones acuosas estables es la adecuada para conseguir un efecto terapéutico. Como se utiliza en el presente documento, la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad que proporciona el efecto deseado a un animal e incluye tanto la administración para el tratamiento y profilaxis. La cantidad variará de un individuo a otro y dependerá de varios factores, que incluyen el estado físico completo del paciente y la causa subyacente de la afección que se trata. La cantidad del polipéptido bG-CSF o una variante del mismo que se utiliza para la terapia proporciona una tasa de cambio aceptable y mantiene la respuesta deseada a un nivel beneficioso. Una cantidad terapéuticamente eficaz de las presentes composiciones puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica utilizando materiales y procedimientos disponibles públicamente. Por ejemplo, la cantidad de polipéptido bG-CSF o una variante del mismo puede presentarse en la formulación en una cantidad de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 12 gramos/litro, preferentemente de aproximadamente 5 gramos/litro.

Las formulaciones acuosas estables de un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo se pueden formular con varios valores de pH. En algunas realizaciones, la formulación acuosa estable puede tener un valor de pH de entre aproximadamente 5,7 a aproximadamente 6,6. En una realización, la formulación acuosa estable tiene un pH de entre aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,3. El valor de pH deseado de la formulación se ajusta añadiendo bases tales como hidróxidos alcalinos, hidróxidos alcalinotérreos, o hidróxido amónico. El hidróxido sódico se utiliza preferentemente para el ajuste del pH. El ajuste del pH deseado puede conseguirse en principio añadiendo soluciones básicas. En general, se pueden utilizar sales de bases fuertes con ácidos débiles, tales como acetato sódico, citrato sódico, fosfato hidrógeno disódico o dipotásico o carbonato sódico. Si la solución farmacéutica de una sustancia auxiliar tiene un valor de pH básico, se ajusta por titulación con un ácido hasta que se alcanza el intervalo de pH deseado de 4-5 o 7-8. Se toman en consideración como ácidos, los ácidos orgánicos o inorgánicos que se toleran fisiológicamente, tales como por ejemplo ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido cítrico, o

soluciones convencionales o sustancias que tienen un valor de pH ácido. A este respecto, algunas sustancias de ejemplo son sales de ácidos fuertes con bases débiles tales como por ejemplo, fosfato dihidrógeno sódico o fosfato dihidrógeno potásico.

Como se demuestra en los ejemplos posteriores, las formulaciones con bG-CSF muestran deseablemente concentraciones con baja agregación del polipéptido bG-CSF o una variante del mismo en condiciones tensas de almacenamiento y condiciones aceleradas de almacenamiento. Como se utiliza en el presente documento, las condiciones tensas de almacenamiento se evalúan tras incubación de las muestras de formulación a 25 °C durante 5 días. Como se utiliza en el presente documento, las condiciones de almacenamiento acelerado se evalúan tras la incubación de las muestras de formulación a 40 °C durante 1 día. Las condiciones de almacenamiento se pueden evaluar también a otras temperaturas y duraciones distintas. Por ejemplo, se podrían evaluar las condiciones de almacenamiento tras la incubación de las muestras de formulación a 25 °C durante 28 días o tras la incubación de las muestras de formulación a 40 °C durante 3 días.

La concentración de agregados del polipéptido bG-CSF o una variante del mismo se analizan después de las condiciones tensas de almacenamiento y las condiciones de almacenamiento acelerado. En algunas realizaciones, las formulaciones de bG-CSF de la presente invención tienen una concentración de agregados del polipéptido bG-CSF o una variante del mismo de menos de aproximadamente el 2,1% (porcentaje peso/peso) en condiciones tensas de almacenamiento. En otras realizaciones, las formulaciones bG-CSF tienen una concentración de agregados del polipéptido bG-CSF o una variante del mismo de menos de aproximadamente el 1,5% (porcentaje peso/peso) en condiciones tensas de almacenamiento. En algunas realizaciones, las formulaciones bG-CSF tienen una concentración de agregados del polipéptido bG-CSF o una variante del mismo de menos de aproximadamente 1,5% (porcentaje peso/peso) en condiciones de almacenamiento acelerado.

Además, se pueden utilizar estudios de agitación forzada o estudios de congelación-descongelación para evaluar las propiedades de estabilidad de una formulación. Por ejemplo, un estudio de agitación forzada podría consistir en mezclar una muestra de formulación en un vaso de precipitados de cristal a una velocidad fijada, tal como 60 rpm, utilizando un agitador magnético. El agitado podría producirse durante un periodo de tiempo determinado, tal como dos horas, con el fin de determinar las características de la muestra de formulación. Un ciclo de congelación-descongelación podría consistir en la congelación de una muestra de la formulación durante 1 hora a aproximadamente -75 °C y descongelando a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora hasta que no se observe hielo.

Además, como se demuestra en los ejemplos posteriormente, las formulaciones de bG-CSF pueden mostrar unas propiedades de desestabilización y/o despegilación deseables del polipéptido bG-CSF o una variante del mismo en condiciones tensas de almacenamiento y en condiciones de almacenamiento acelerado. Como se utiliza en el presente documento el término "despegilación" puede referirse a la estabilidad de la unión de los restos pegilados que se unen a un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo, es decir, si tales restos pegilados permanecen unidos al polipéptido a lo largo del tiempo, por ejemplo durante el almacenamiento en una solución acuosa o si tienden a desprenderse, por ejemplo como resultado de hidrólisis de la unión éster.

En algunas realizaciones, las formulaciones acuosas estables de un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo puede formularse utilizando citrato como sustancia tampón y arginina como excipiente. En una realización, la formulación acuosa se puede preparar utilizando ácido cítrico monohidrato (Fisher, C/6200/60 o equivalente) como sustancia tampón y L-Arginina (Sigma, A8094 o equivalente) como excipiente. La formulación acuosa se puede preparar añadiendo $1,6 \pm 0,1$ gramos de ácido cítrico monohidrato y $10,9 \pm 0,1$ gramos de L-arginina hasta 200 ml de agua de alta calidad. A partir de entonces, se puede ajustar el pH a $6,0 \pm 0,1$ utilizando ácido clorhídrico y la mezcla se puede diluir hasta 250 ml utilizando agua de alta calidad. La formulación resultante puede comprender 30 mM de citrato, 250 mM arginina, y polipéptido bG-CSF o una variante del mismo a un pH de 6,0.

Las preparaciones acuosas se pueden utilizar para producir liofilizados por liofilización convencional o polvos. Las preparaciones se obtienen de nuevo disolviendo los liofilizados en soluciones acuosas. El término "liofilización", también conocida como secado por congelación, es una técnica comúnmente empleada para presentar proteínas que sirve para eliminar el agua de la preparación de proteína de interés. La liofilización es un proceso por el que el material que se va a secar primero se congela y luego el hielo o disolvente congelado se elimina por sublimación en un ambiente al vacío. Se puede incluir un excipiente en formulaciones pre-liofilizadas para aumentar la estabilidad durante el proceso de secado por congelación y/o mejorar la estabilidad del producto liofilizado en el almacenamiento. Por ejemplo, véase Pikal, M. Biopharm. 3(9)26-30 (1990) y Arakawa y col. Pharm. Res. 8(3):285-291 (1991).

El secado por pulverización de ingredientes farmacéuticos también es conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, véase Broadhead, J. y col., "The Spray Drying of Pharmaceuticals," in Drug Dev. Ind. Pharm, 18 (11 & 12), 1169-1206 (1992). Además de los productos farmacéuticos de molécula pequeña, se ha secado por pulverización una variedad de materiales biológicos incluyendo: enzimas, sueros, plasma, microorganismos y levaduras. El secado por pulverización es una técnica útil debido a que puede convertir una preparación farmacéutica líquida en un polvo aglomerado o sin polvo, fino en un proceso de una etapa. La técnica básica comprende las cuatro etapas siguientes: a) atomización de la solución de alimentación en un pulverizador; b) contacto pulverizado-aire; c) secado

del pulverizado; y d) separación del producto seco del aire de secado. Por ejemplo, las Pat. de EE. UU. N^{os} 6.235.710 y 6.001.800 describen la preparación de eritropoyetina recombinante por secado por pulverización.

Los procedimientos para el uso de una formulación que contiene un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo también están englobados en la presente divulgación. El bG-CSF tiene una variedad de actividades biológicas que incluyen pero no se limitan a la unión a su receptor, producción de dimerización de su receptor, estimulación de la producción de neutrófilos, y estimulación de la proliferación y diferenciación celular. Ejemplos de algunas de las actividades biológicas del factor estimulante de colonias de granulocitos y bG-CSF se describen anteriormente y en las Pat. de EE. UU. N^{os} 6.676.947; 6.579.525; 6.531.121; 6.521.245; 6.489.293; 6.368.854; 6.316.254; 6.268.336; 6.239.109; 6.165.283; 5.986.047; 5.830.851; 5.043.156; y 5.773.569. Las formulaciones que contienen el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo son útiles para tratar o prevenir un amplio intervalo de trastornos. "Prevenir" se refiere a reducir la probabilidad de que el receptor contraiga o desarrolle cualquiera de las afecciones patológicas descritas en el presente documento e incluye la administración profiláctica. El término "prevenir" es particularmente aplicable a un paciente que es susceptible a la afección patológica en particular. "Tratar" se refiere a mediatizar una enfermedad o afección y prevenir, revertir los efectos clínicos de la enfermedad, o mitigar, su posterior progresión o mejorar los síntomas asociados con la enfermedad o afección.

La administración de productos bG-CSF da como resultado la formación de glóbulos blancos. Por lo tanto, la administración de una formulación que contiene el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo puede ser útil para prevenir la infección en animales que están en riesgo de infección. Una formulación que contiene el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo se puede administrar a animales que tienen una infección. Las infecciones que se pueden tratar con una formulación que contiene el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo incluyen, pero no se limitan a, mastitis y fiebre del transporte. Una formulación que contiene un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo podría administrarse a un animal, por ejemplo, entre dos semanas y un día antes del parto y opcionalmente se podría dar una administración adicional el día del parto o hasta una semana después del parto. En algunas realizaciones, el animal al que se administra una formulación que contiene un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo es una vaca, y dar a luz se denomina "parir". En una realización, se puede administrar una formulación de la invención que contiene el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo a vacas periparturientas para la prevención de mastitis.

Una formulación que contiene el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo se puede administrar por cualquier vía convencional adecuada para las proteínas o péptidos, incluyendo, pero sin limitarse a, la vía parenteral, por ejemplo, en inyección, sin limitarse a, subcutánea, o intravenosa o cualquier otra forma de inyecciones o infusiones. Las formulaciones que contienen un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo se pueden administrar por varias vías que incluyen pero sin limitarse a la oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, transdérmica, subcutánea, tópica, sublingual, intravascular, intramamaria, o rectal. Las formulaciones que contienen un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo también se pueden administrar por medio de liposomas. Tales vías de administración y formulaciones apropiadas son en general conocidas por los expertos en la técnica. Las formulaciones que contienen un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo, solo o en combinación con otros componentes adecuados, se pueden fabricar también en formulaciones en aerosol (es decir, se pueden "nebulizar") para administrarse por medio de inhalación. Las formulaciones en aerosol pueden colocarse en propulsores presurizados aceptables, tales como diclorofluorometano, propano, nitrógeno, y similares.

Las formulaciones que contienen un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo adecuadas para su administración parenteral, tales como, por ejemplo, por vía intraarticular (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, y subcutánea, incluyen soluciones inyectables acuosas y no acuosas, estériles isotónicas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, y solutos de hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor que se pretende, y suspensiones acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes suspensores, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores, y conservantes. Las formulaciones que contienen un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo se pueden presentar en envases sellados de dosis unitaria o multidosis, tales como ampollas y viales. Las formulaciones que contienen un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo también se pueden presentar en jeringas, tales como jeringas pre-cargadas.

La administración parenteral y la administración intravenosa son procedimientos de administración posibles de las formulaciones de la presente divulgación. En particular, la vía de administración que ya está en uso para agentes terapéuticos homólogos de aminoácidos naturales (incluyendo pero sin limitarse a los que se utilizan típicamente para EPO, GH, G-CSF, GM-CSF, IFN, interleucinas, anticuerpos, FGF, y/o cualquier otra proteína suministrada farmacéuticamente), junto con formulaciones que se usan actualmente, proporcionan vías posibles de administración y formulaciones que contienen un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo.

En algunas realizaciones, las formulaciones contienen un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo en una cantidad entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 12 gramos/litro. La dosis administrada a un animal, en el contexto de la presente invención, es suficiente para obtener una respuesta terapéutica beneficiosa en el animal a lo largo del tiempo, u otra actividad apropiada, dependiendo de la aplicación. La dosis se determina por la eficacia del vector en particular, o la formulación, y la actividad, estabilidad o semivida en el suero del polipéptido con el aminoácido no natural empleado y la afección del animal, así como el peso corporal o el área de superficie del animal que se va a tratar. El tamaño de la dosis se determina también por la existencia, naturaleza, y extensión de

cualquier efecto secundario que acompaña la administración de un vector en particular, formulación, o similar en un animal particular.

La dosis administrada a un animal debería ser suficiente para producir una respuesta beneficiosa en el sujeto a lo largo del tiempo. En general, la cantidad farmacéuticamente eficaz total por dosis del polipéptido bG-CSF o una variante del mismo que se administra por vía parenteral está en el intervalo de aproximadamente 0,01 µg/kg/día a aproximadamente 100 µg/kg, de peso corporal del animal, aunque está sujeta a la discreción terapéutica. De manera alternativa, la cantidad terapéuticamente eficaz por dosis del polipéptido bG-CSF o una variante del mismo que se administra por vía parenteral es aproximadamente de 1 mg a aproximadamente 25 mg, o de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 20 mg. Por ejemplo, la cantidad farmacéuticamente eficaz por dosis puede ser de aproximadamente 14 mg. La frecuencia de dosificación también está sometida a la discreción terapéutica.

La cantidad farmacéuticamente eficaz del polipéptido bG-CSF o una variante del mismo se puede administrar a los animales como una dosis única o como parte de una programación multidosis. Por ejemplo, el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo se puede administrar como una programación multidosis en el que la programación es al menos un régimen de dos dosis. En una realización, la programación multidosis es un régimen de dos dosis.

En una realización, la programación multidosis comprende una primera dosis que se administra a un animal aproximadamente 1 día a aproximadamente 14 días antes de que el animal tenga el parto y la segunda dosis se administra al animal aproximadamente 4 días antes a aproximadamente 7 días después del parto del animal. En otra realización, la programación multidosis comprende una primera dosis que se administra a un animal aproximadamente 7 días antes de que el animal tenga el parto y la segunda dosis se administra al animal el día que el animal pare.

Se contemplan también las siguientes realizaciones:

1. Una formulación acuosa estable que comprende un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo, una sustancia tampón, y un excipiente, en que dicha formulación está sustancialmente libre de monolaurato de sorbitán polioxietileno (20).

2. La formulación de la cláusula 1 en la que el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo está unido a un engarce, un polímero, o una molécula biológicamente activa.

3. La formulación de la cláusula 1 o la cláusula 2 en la que el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo está unido a un polímero hidrosoluble.

4. La formulación de la cláusula 3 en que el polímero hidrosoluble comprende un resto de poli(etilenglicol).

5. La formulación de la cláusula 3 o la cláusula 4 en que el polímero hidrosoluble tiene un peso molecular de entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 100 kDa.

6. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 3 a 5 en que el polímero hidrosoluble tiene un peso molecular de entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 50 kDa.

7. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 3 a 6 en la que el polímero hidrosoluble tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa.

8. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 1 a 7 en la que el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo es bG-CSFT133pAF-20K PEG.

9. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 1 a 8 en la que el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo está presente en una cantidad de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 12 gramos/litro.

10. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 1 a 9 en la que el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo está presente en una cantidad de aproximadamente 5 gramos/litro.

11. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 1 a 10 en la que la sustancia tampón es citrato, histidina, maleato, succinato, fosfato, o una combinación de los mismos.

12. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 1 a 11 en la que la sustancia tampón es citrato o succinato.

13. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 1 a 12 en la que la sustancia tampón es citrato.

14. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 1 a 12 en la que la sustancia tampón es succinato.

15. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 1 a 14 en la que la sustancia tampón tiene una molaridad de entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM.

16. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 1 a 15 en la que la sustancia tampón tiene una molaridad de aproximadamente 30 mM.
17. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 1 a 16 en la que el excipiente es cloruro sódico, trehalosa, sorbitol, arginina, o una combinación de los mismos.
- 5 18. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 1 a 17 en la que el excipiente es arginina.
19. La formulación de la cláusula 18 en la que la arginina tiene una molaridad de entre aproximadamente 100 mM a aproximadamente 500 mM.
20. La formulación de la cláusula 18 o la cláusula 19 en la que la arginina tiene una molaridad de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 300 mM.
- 10 21. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 18 a 20 en la que la arginina tiene una molaridad de aproximadamente 250 mM.
22. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 1 a 21 en que la formulación tiene un pH de entre aproximadamente 5,7 a aproximadamente 6,6.
- 15 23. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 1 a 22 en que la formulación tiene un pH de entre aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,3.
24. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 1 a 23 en que la formulación tiene una concentración de agregados media del polipéptido bG-CSF o una variante del mismo de menos de aproximadamente el 2,1% p/p% tras un periodo de incubación de 5 días en condiciones tensas de almacenamiento.
- 20 25. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 1 a 24 en que la formulación tienen una concentración de agregados media de polipéptido bG-CSF o una variante del mismo de menos de aproximadamente 1,5% p/p% tras un periodo de un día de incubación en condiciones de almacenamiento acelerado.
26. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 1 a 25 que incluye opcionalmente uno o más de otros agentes terapéuticos.
27. Un liofilizado o polvo de la formulación de una cualquiera de las cláusulas 1 a 26.
- 25 28. Una solución acuosa producida por disolución del liofilizado o polvo de la cláusula 27 en agua.
29. Un proceso para preparar la formulación de una cualquiera de las cláusulas 1 a 26 que comprende la formación de una solución acuosa estable que comprende un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo, una sustancia tampón, y un excipiente, en el que dicha formulación está sustancialmente libre de monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20).
- 30 30. Un procedimiento de tratamiento de un animal que tiene un trastorno modulado por el bG-CSF que comprende la administración a dicho animal de una cantidad terapéuticamente eficaz de la formulación de una cualquiera de las cláusulas 1 a 26.
31. El procedimiento de la cláusula 30 en que dicho trastorno es una infección.
- 35 32. El procedimiento de la cláusula 31 en el que dicha infección es una mastitis y en el que dicho animal es una vaca periparturienta.
33. Una formulación acuosa estable que comprende un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo, un tampón citrato o succinato, arginina, y opcionalmente un contraión para la arginina.
34. La formulación de la cláusula 33 en que la formulación está libre sustancialmente de un tensioactivo polisorbato.
- 40 35. La formulación de la cláusula 33 o la cláusula 34 en la que el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo está unido a un engarce, un polímero, o una molécula biológicamente activa.
36. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 33 a 35 en la que el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo está unido a un polímero hidrosoluble.
37. La formulación de la cláusula 36 en la que el polímero hidrosoluble comprende un resto poli(etilenglicol).
- 45 38. La formulación de la cláusula 36 o la cláusula 37 en la que el polímero hidrosoluble tiene un peso molecular de entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 100 kDa.
39. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 36 a 38 en la que el polímero hidrosoluble tiene un peso

molecular de entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 50 kDa.

40. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 36 a 39 en la que el polímero hidrosoluble tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa.
- 5 41. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 34 a 40 en la que dicho tensioactivo polisorbato es un derivado polioxietilenado de monolaurato sódico.
42. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 34 a 41 en la que dicho tensioactivo polisorbato es monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20).
43. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 33 a 42 en la que el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo es bG-CSFT133pAF-20K PEG.
- 10 44. La formulación de la cláusula 43 en la que el bG-CSFT133pAF-20K PEG está presente en una cantidad de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 12 gramos/litro, el tampón citrato tiene una molaridad de aproximadamente 30 mM, la arginina tiene una molaridad de aproximadamente 250 mM, y en que la formulación tiene un valor del pH de aproximadamente 6,0.
- 15 45. La formulación de la cláusula 43 o la cláusula 44 en que la formulación tiene una concentración media de agregados de bG-CSFT133pAF-20K PEG de menos de aproximadamente el 1,6% p/p% tras un periodo de incubación de 28 días a 25 °C.
46. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 43 a 45 en que la formulación tiene una concentración media de agregados de bG-CSFT133pAF-20K PEG de menos de aproximadamente 2,8% p/p% tras un periodo de incubación de 3 días a 40 °C.
- 20 47. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 43 a 46 en que la formulación tiene una concentración media de agregados de bG-CSFT133pAF-20K PEG de aproximadamente el 1,6% p/p% o menos después de un estudio con agitación forzada.
48. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 43 a 47 en que la formulación tiene una concentración media de agregados de bG-CSFT133pAF-20K PEG de menos de aproximadamente 1,6% p/p% después de cinco ciclos de congelación-descongelación.
- 25 49. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 33 a 48 en la que el contraíón para la arginina es cloruro o sulfato.
50. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 33 a 49 que incluye opcionalmente uno o más de otros ingredientes terapéuticos.
- 30 51. Un liofilizado o polvo de la formulación de una cualquiera de las cláusulas 33 a 50.
52. Una solución acuosa producida por disolución del liofilizado o el polvo de la cláusula 51 en agua.
53. Un proceso para preparar la formulación de una cualquiera de las cláusulas 33 a 50 que comprende la formación de una solución acuosa estable que comprende el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo, un tampón citrato, arginina, y opcionalmente un contraíón para la arginina.
- 35 54. El proceso de la cláusula 53 en el que la formulación está sustancialmente libre de un tensioactivo polisorbato.
55. El proceso de la cláusula 53 o la cláusula 54 en el que el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo es bG-CSFT133pAF-20K PEG.
- 40 56. Un procedimiento de tratamiento de un animal que tiene un trastorno modulado por bG-CSF que comprende la administración a dicho animal de una cantidad terapéuticamente eficaz de la formulación de una cualquiera de las cláusulas 33 a 50.
57. El procedimiento de la cláusula 56 en el que dicho trastorno es una infección.
58. El procedimiento de la cláusula 57 en el que dicha infección es una mastitis y en el que dicho animal es una vaca periparturienta.
- 45 59. Una formulación acuosa estable que consiste esencialmente en un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo, un tampón citrato o succinato, arginina, y opcionalmente un contraíón para la arginina.
60. La formulación de la cláusula 59 en que la formulación está sustancialmente libre de tensioactivo.
61. La formulación de la cláusula 59 o la cláusula 60 en que el polipéptido bG-CSF o la variante del mismo está

unido a un engarce, un polímero, o una molécula biológicamente activa.

62. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 59 a 61 en la que el polipéptido bG-CSF o la variante del mismo está unido a un polímero hidrosoluble.

63. La formulación de la cláusula 62 en la que el polímero hidrosoluble comprende un resto poli(etilenglicol).

5 64. La formulación de la cláusula 62 o la cláusula 63 en la que el polímero hidrosoluble tiene un peso molecular de entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 100 kDa.

65. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 62 a 64 en la que el polímero hidrosoluble tiene un peso molecular de entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 50 kDa.

10 66. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 62 a 65 en la que el polímero hidrosoluble tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa.

67. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 60 a 66 en la que dicho tensioactivo es un tensioactivo polisorbato.

68. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 60 a 67 en la que dicho surfactante es un derivado polioxietileno del monolaurato sódico.

15 69. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 60 a 68 en la que dicho tensioactivo es monolaurato de sorbitán polioxietileno (20).

70. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 59 a 69 en la que el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo es bG-CSFT133pAF-20K PEG.

20 71. La formulación de la cláusula 70 en la que el bG-CSFT133pAF-20K PEG está presente en una cantidad de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 12 gramos/litro, el tampón citrato tiene una molaridad de aproximadamente 30 mM, la arginina tiene una molaridad de aproximadamente 250 mM, y en que la formulación tiene un valor del pH de aproximadamente 6,0.

25 72. La formulación de la cláusula 70 o la cláusula 71 en que la formulación tiene una concentración media de agregados de bG-CSFT133pAF-20K PEG de menos de aproximadamente el 1,6% p/p% tras un periodo de incubación de 28 días a 25 °C.

73. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 70 a 72 en que la formulación tiene una concentración media de agregados de bG-CSFT133pAF-20K PEG de menos de aproximadamente el 2,8% p/p% tras un periodo de incubación de 3 días a 40 °C.

30 74. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 70 a 73 en que la formulación tiene una concentración media de agregados de bG-CSFT133pAF-20K PEG de aproximadamente el 1,6% o menos tras un estudio de agitación forzada.

75. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 70 a 74 en que la formulación tiene una concentración media de agregados de bG-CSFT133pAF-20K PEG de menos de aproximadamente el 1,6% tras cinco ciclos de congelación-descongelación.

35 76. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 59 a 75 en la que el contraíón para la arginina es cloruro o sulfato.

77. La formulación de una cualquiera de las cláusulas 59 a 76 que incluye opcionalmente uno o más de otros ingredientes terapéuticos.

78. Un liofilizado o polvo de la formulación de una cualquiera de las cláusulas 59 a 77.

40 79. Una solución acuosa producida por disolución del liofilizado o polvo de la cláusula 78 en agua.

80. Un proceso para preparar la formulación de una cualquiera de las cláusulas 59 a 77 que comprende la formación de una solución acuosa estable que consiste esencialmente en un polipéptido bG-CSF o una variante del mismo, un tampón citrato, arginina, y opcionalmente un contraíón para la arginina.

81. El proceso de la cláusula 80 en el que la formulación está sustancialmente libre de un tensioactivo.

45 82. El proceso de la cláusula 80 o la cláusula 81 en el que el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo es bG-CSFT133pAF-20K PEG.

83. Un procedimiento de tratamiento de un animal que tiene un trastorno modulado por bG-CSF que comprende la administración a dicho animal de una cantidad terapéuticamente eficaz de la formulación de una cualquiera de

las cláusulas 59 a 77.

84. El procedimiento de la cláusula 83 en el que dicho trastorno es una infección.

85. El procedimiento de la cláusula 84 en el que dicha infección es una mastitis y en el que dicho animal es una vaca periparturienta.

- 5 86. Una formulación acuosa estable que consiste esencialmente en bG-CSFT133pAF-20K PEG, un tampón citrato en la que el tampón citrato tiene una molaridad de aproximadamente 30 mM, arginina en la que la arginina tiene una molaridad de aproximadamente 250 mM, y opcionalmente un contraión para la arginina.

Ejemplo 1

Estudio de selección del tampón y el excipiente

- 10 Las formulaciones de bG-CSFT133-20K PEG sin monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20) de fondo se pueden explorar para evaluar la estabilidad del producto utilizando múltiples tampones y excipientes (cloruro sódico, trehalosa, y arginina). El pH diana para todos los tampones de diálisis es un pH de 6,0. Para la comparación, se puede preparar una formulación que contenga 10 mM de fosfato, 180 mM de manitol, y 60 mM de trehalosa a un pH de 6,0. Las formulaciones se pueden evaluar en cuanto a los efectos sobre la agregación de las proteínas y la despegilación en presencia y ausencia de oxígeno.

- 15 Las muestras se pueden preparar dializando 1ml de bG-CSFT133-20K PEG a 2-8 °C en cada formulación. La concentración de proteínas de las muestras dializadas se puede determinar antes de normalizar la concentración de proteínas a 5 mg/ml. Tras la diálisis y normalización de la concentración, se pueden cargar 3x1 ml del grupo post-dializado y diluido en viales de cristal de 5 ml. Un grupo de muestras se puede ensayar para proporcionar las condiciones iniciales. Un segundo grupo se puede almacenar a 25 °C/60% HR durante 5 días antes del ensayo. El tercer grupo de muestras se puede desgasear en la cámara de liofilización, cerrarse bajo una atmósfera inerte (nitrógeno), y luego almacenarlo a 25 °C/60% RH durante 5 días antes del ensayo. Si el nivel de agregación que se mide por SEC tras 5 días es $\leq 2,0\%$, tanto las muestras desgaseadas como las no desgaseadas se pueden incubar a 40 °C durante un día.

- 25 Tras cinco días de incubación, se puede medir la concentración proteica de cada muestra. La Tabla 1 muestra las concentraciones de proteínas.

Tabla 1. Concentraciones de proteínas en el estudio de selección del tampón y el excipiente

Muestra N°	Descripción de la muestra	Tras 5 días a 2-8°C Concentración (mg/ml)	Tras 5 días a 25°C Concentración (mg/ml) NO-DESGAS.	Tras 5 días a 25°C Concentración (mg/ml) DESGAS.
1	10 mM Citrato, 0,1 M Arginina	5,75	5,29	5,93
2	10 mM Citrato, 0,15 M NaCl	6,35	6,71	5,45
3	10 mM Citrato, 0,3 M Trehalosa	5,71	5,78	5,79
4	10 mM Histidina, 0,15 M NaCl	5,39	5,19	5,42
5	10 mM Histidina, 0,3 M Trehalosa	5,30	5,08	5,34
6	10 mM Histidina, 0,1 M Arginina	5,56	5,06	5,27
7	10 mM Maleato, 0,15 M NaCl	5,50	5,40	5,73
8	10mM Maleato, 0,3 M Trehalosa	4,41	4,01	4,13

9	10 mM Maleato, 0,1 M Arginina	5,69	5,41	5,39
10	10 mM Succinato, 0,15 M NaCl	5,94	5,88	5,83
11	10 mM Succinato, 0,3 M Trehalosa	5,57	5,79	5,66
12	10mM Succinato, 0,1 M Arginina	4,96	4,92	4,78
13	10 mM fosfato, 0,15 M NaCl	5,20	5,18	5,03
14	10 mM fosfato, 0,3 M Trehalosa	5,13	5,30	5,24
15	10 mM fosfato, 0,1 M Arginina	5,22	5,04	5,12
16	10mM fosfato 180mM Manitol, 60mM Trehalosa	5,28	5,22	5,21

La Tabla 2 muestra los resultados del pH de cada muestra.

Tabla 2. Resultados del pH en el estudio de selección del tampón y el excipiente

Condiciones del tampón	pH del Tampón de Diálisis	pH Tras la Diálisis	pH a los 5 días a 2-8 °C	pH a los 5 días a 25 °C	pH a los 5 días a 25 °C Desgaseado
10 mM Citrato, 0,1 M Arginina	6,49	6,44	6,48	6,57	6,53
10 mM Citrato, 0,15 M NaCl	6,51	6,47	6,52	6,55	6,61
10 mM Citrato, 0,3 M Trehalosa	6,11	6,07	6,10	6,16	6,18
10 mM Histidina, 0,15 M NaCl	5,86	5,85	5,91	5,91	5,95
10 mM Histidina, 0,3 M Trehalosa	5,78	5,81	5,92	5,96	5,95
10 mM Histidina, 0,1 M Arginina	6,22	6,23	6,30	6,32	6,29
10 mM Maleato, 0,15 M NaCl	6,22	6,22	6,28	6,32	6,29
10 mM Maleato, 0,3 M Trehalosa	6,06	6,03	6,11	6,13	6,12
10 mM Maleato, 0,1 M Arginina	6,24	6,23	6,34	6,34	6,32
10 mM Succinato, 0,15 M NaCl	6,14	6,13	6,19	6,26	6,31
10 mM Succinato, 0,3 M Trehalosa	6,09	6,07	6,13	6,13	6,16
10 mM Succinato, 0,1 M Arginina	6,14	6,14	6,30	6,34	6,34
10 mM Fosfato, 0,15 M NaCl	6,29	6,26	6,30	6,33	6,37
10 mM Fosfato, 0,3 M Trehalosa	5,97	5,98	6,03	6,10	6,13
10 mM Fosfato, 0,1 M Arginina	6,40	6,38	6,41	6,47	6,47
10 mM Fosfato, 180 mM Manitol, 60 mM Trehalosa	6,09	6,04	6,14	6,11	6,12

La agregación proteica y los niveles de despegilación de cada formulación se pueden analizar por SEC. La Tabla 3 muestra los resultados de la SEC e indica que la agregación y los niveles de despegilación eran similares en todas las muestras.

Tabla 3. Resultados de la SEC del Estudio de Selección de Tampón y Excipiente (Post-incubaciones de 5 días)

Muestra	Muestras de Control (2-8°C)			Incubación de 5 Días a 25°C			Incubación de 5 Días a 25°C (DESGAS)		
	% Med. Agregado	% Med. bGCSF	% Med. PEG-bGCSF	% Med. bGCSF	% Med. Agregado	% Med. PEG-bGCSF	% Med. bGCSF	% Med. PEG-bGCSF	% Med. bGCSF
bGCSF-T133-20KPEG Pre-dializado NB0801-04-04	0,7	98,5		0,7	N/A				
10 mM Citrato, 0,15 M NaCl	1,2	98,3		0,5	1,6		0,5	1,6	98,0
10 mM Citrato, 0,3 M Trehalosa	1,3	98,3		0,4	1,5		0,4	1,7	97,8
10 mM Citrato, 0,1 M Arginina	1,3	98,2		0,4	1,4		0,5	1,5	98,0
10 mM Histidina, 0,15 M NaCl	1,3	98,1		0,6	1,5		0,7	1,6	97,8
10 mM Histidina, 0,3 M Trehalosa	1,3	98,2		0,5	1,7		0,5	1,9	97,6
10 mM Histidina, 0,1 M Arginina	1,3	98,1		0,6	1,3		0,7	1,5	97,8
10 mM Maleato, 0,15 M NaCl	1,4	98,1		0,5	1,6		0,6	1,7	97,7
10 mM Maleato, 0,3 M Trehalosa	1,3	98,2		0,4	1,7		0,4	1,7	97,9
10 mM Maleato, 0,1 M Arginina	1,3	98,2		0,6	1,3		0,6	1,4	97,9
10 mM Succinato, 0,15 M NaCl	1,4	98,1		0,5	1,6		0,6	1,9	97,5
10 mM Succinato, 0,3 M Trehalosa	1,3	98,3		0,4	1,7		0,4	1,9	97,7
10 mM Succinato, 0,1 M Arginina	1,5	98,0		0,6	1,5		0,6	2,0	97,4
10 mM Fosfato, 0,15 M NaCl	1,1	98,2		0,7	1,3		0,7	1,4	97,9
10 mM Fosfato, 0,3 M Trehalosa	1,1	98,4		0,5	1,7		0,6	1,8	97,6
10 mM Fosfato, 0,1 M Arginina	1,1	98,2		0,6	1,3		0,7	1,5	97,8

(continuación)

Muestra	Muestras de Control (2-8°C)			Incubación de 5 Días a 25°C			Incubación de 5 Días a 25°C (DESGAS)		
	% Med. Agregado	% Med. bGCSF	% Med. PEG-bGCSF	% Med. Agregado	% Med. bGCSF	% Med. PEG-bGCSF	% Med. Agregado	% Med. bGCSF	% Med. bGCSF
10 mM Fosfato, 0,18 M Manitol, 0,06 M Trehalosa	1,2	98,3	0,5	2,0	97,5	0,5	2,1	97,4	0,5

La Tabla 4 muestra los resultados de la SEC para las muestras incubadas a 40 °C durante un día. La comparación de la composición de agregados indica que las formulaciones que contienen arginina tenían la agregación del producto más baja. Además, la formulación de referencia 10 mM de fosfato, 180 mM de Manitol, y 60 mM de Trehalosa pH 6 tiene el nivel de agregación más alto si se compara con todas las otras formulaciones del estudio de selección.

Tabla 4. Resultados de la SEC del Estudio de Selección del Tampón y el Excipiente
(tras la incubación de 1 día)

	Incubación de 1 día 40°C			Incubación de 1 día 40°C (DESGAS)		
Muestra	% Med. Agregado	% Med. PEG-bGCSF	% Med. bGCSF	% Med. Agregado	% Med. PEG-bGCSF	% Med. bGCSF
10 mM Citrato, 0,15 M NaCl	6,5	93,3	0,1	7,2	92,7	0,1
10 mM Citrato, 0,3 M Trehalosa	4,1	95,8	0,1	4,3	95,6	0,1
10 mM Citrato, 0,1 M Arginina	3,9	95,9	0,2	3,3	96,5	0,2
10 mM Histidina, 0,15 M NaCl	6,0	93,8	0,2	5,9	93,9	0,2
10 mM Histidina, 0,3 M Trehalosa	8,4	91,5	0,1	9,3	90,6	0,1
10 mM Histidina, 0,1 M Arginina	3,0	96,7	0,3	2,9	96,8	0,3
10 mM Maleato, 0,15 M NaCl	5,9	93,9	0,2	6,0	93,9	0,1
10 mM Maleato, 0,3 M Trehalosa	7,3	92,7	0,1	7,4	92,5	0,1
10 m Maleato, 0,1 M Arginina	3,0	96,8	0,2	3,1	96,7	0,2
10 mM Succinato, 0,15 M NaCl	4,3	95,5	0,2	5,3	94,6	0,1
10 mM Succinato, 0,3 M Trehalosa	9,6	90,3	0,1	10,8	89,1	0,1
10 mM Succinato, 0,1 M Arginina	2,1	97,6	0,3	2,6	97,2	0,2
10 mM Fosfato, 0,15 M NaCl	5,9	94,0	0,2	5,9	93,9	0,1
10 mM Fosfato, 0,3 M Trehalosa	16,0	84,0	0,0	18,2	81,8	0,0
10 mM Fosfato, 0,1 M Arginina	4,5	95,2	0,2	3,8	96,0	0,2
10 mM Fosfato, 0,18 M Manitol, 0,06 M Trehalosa	22,8	77,2	0,0	25,0	75,0	0,0

Los resultados de este estudio de selección indican que las formulaciones de succinato, histidina, maleato, y citrato sin monolaurato de sorbitán polioxietileno (20) tienen todas un aumento insignificante de agregados (menos del 1% por la SEC) tras una incubación de cinco días a 25 °C. Tampoco existen diferencias en la estabilidad proteica

entre las muestras desgaseadas y no desgaseadas. Además, los resultados de la SEC de las muestras en tensión a 40 °C durante un día muestran que las formulaciones que contienen 0,1 M de arginina tienen menos agregación en comparación con las formulaciones que contienen como excipientes cloruro sódico y trehalosa.

Ejemplo 2

5 Efecto del monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20) sobre las formulaciones de bG-CSF

Se puede evaluar el efecto del monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20) sobre la agregación para determinar el impacto en las futuras formulaciones por estudios de agitación. Las muestras se pueden preparar dializando 4 ml de bGCSF-T133-20K PEG a 2-8 °C en 10 mM de Fosfato y 150 mM de NaCl a un pH de 6,0. Después de la diálisis, al grupo dializado se le puede añadir un 1% de solución de reserva de monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20) y luego se puede diluir con 10 mM de Fosfato y 150 mM de NaCl a pH 6,0 hasta una concentración proteica final de 5 mg/ml. Las muestras de cada formulación se pueden dividir en 2 x 1 alícuotas y cargarse en viales de cristal de 1 ml para formar dos grupos de muestras. Un grupo se puede almacenar a 2-8 °C y ensayar en condiciones iniciales; un segundo grupo se puede almacenar a 40 °C durante un día.

La Tabla 5 muestra los datos de integración de la SEC e indican que el nivel de agregación aumenta con el aumento de la concentración de monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20). El análisis de las muestras por SEC indica que la agregación de bGCSF-T133-20K PEG aumenta con la concentración de monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20). Como resultado, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20) se puede excluir de la formulación de ensayo para el bGCSF-T133-20K PEG.

Tabla 5. Resultados de la SEC del estudio de monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20)
(tras una incubación de 1 día)

	Inicial			Incubación de 1 Día a 40°C		
Buffer	% Med. Agregado	% Med. PEG-bGCSF	% Med. bGCSF	% Med. Agregado	% Med. PEG-bGCSF	% Med. bGCSF
Grupo NBj0801-04-04 pre-diálisis	0,7	99,0	0,3	N/A		
10 mM fosfato, 150 mM NaCl	0,8	98,2	1,0	2,6	96,6	0,8
10 mM fosfato, 150 mM NaCl, 0,0033% Tween-20	0,8	98,1	1,1	3,7	95,6	0,7
10 mM fosfato, 150mM NaCl, 0,05% Tween-20	0,9	98,0	1,1	9,2	90,1	0,7

Ejemplo 3

Diseño de superficies de respuesta de Box-Behnken (DOE nº 1)

Se puede ensayar el efecto de varias concentraciones de arginina junto con otros parámetros clave de formulación históricos para evaluar los efectos principales así como sus interacciones. El diseño experimental puede ser de respuesta de superficie Box-Behnken en el que cada factor numérico varía entre nivel bajo, central y alto. Además, el tipo de tampón puede ser un factor categórico. La combinación de parámetros se puede duplicar en citrato y succinato, cada uno con tres puntos centrales. El pH se puede fijar en 6,0 para todas las condiciones. Se puede incluir una condición control que comprende 10 mM de fosfato, 150 mM de NaCl, y 0,0033% de monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20) a un pH 6 para su comparación con los resultados históricos.

Se pueden preparar todos los tampones de diálisis a pH 6,0 ± 0,1. El PEG-bGCSF se puede dializar en 18 condiciones de tampón que representan todas las condiciones tampón del estudio DOE nº 1. La recuperación de proteína a lo largo de la etapa de diálisis puede ser en general de ≥ 78% y, por lo tanto, es consistente con el grupo de muestras de diálisis. Después de la diálisis, se puede ajustar la concentración de proteína del grupo dializado con el tampón de diálisis a un valor diana que se muestra en el diseño de respuesta de superficie Box-Behnken. Esto podría resultar en 24 combinaciones de formulación más tres puntos centrales en citrato y tres puntos centrales en succinato. Cada formulación se puede dividir en 3 x 1 ml alícuotas que se cargan en viales de cristal de 1 ml para formar tres grupos de muestras; un grupo se puede ensayar como condiciones iniciales y luego almacenarse a 2-8 °C, un segundo grupo se puede almacenar a 25 °C durante dos semanas, y el tercer grupo se puede almacenar a 40 °C durante un día.

Se pueden analizar los cambios en la concentración del producto para evaluar la estabilidad del producto. La Tabla 6 muestra la concentración de producto de las muestras antes y después de la incubación. Las muestras con 10 mM de citrato, 300 mM de arginina (8 mg/ml) y 10 mM de succinato, 300 mM de arginina (8 mg/ml) tienen el aumento más alto (0,5-0,6 mg/ml) mientras que la diferencia es menor en todas las otras muestras.

5 **Tabla 6. Resumen de la concentración de proteína del estudio DOE nº 1 (Inicial y de 1 día a 40 °C)**

Muestra	Concentración de Proteína (mg/ml)		
	Inicial	40°C durante 1Día	Diferencia
10 mM Citrato, 100 mM Arginina (5 mg/ml)	4,89	5,16	0,27
10 mM Citrato, 300 mM Arginina (2 mg/ml)	1,99	2,05	0,06
10 mM Citrato, 300 mM Arginina (8 mg/ml)	7,60	8,19	0,59
10 mM Citrato, 500 mM Arginina (5 mg/ml)	4,97	4,89	-0,08
30 mM Citrato, 100 mM Arginina (2 mg/ml)	1,99	2,01	0,02
30 mM Citrato, 100 mM Arginina (8 mg/ml)	8,23	8,14	-0,09
30 mM Citrato, 300 mM Arginina (5 mg/ml) Vial A	5,03	4,86	-0,17
30 mM Citrato, 300 mM Arginina (5 mg/ml) Vial B	5,07	4,93	-0,14
30 mM Citrato, 300 mM Arginina (5 mg/ml) Vial C	5,08	5,01	-0,07
30 mM Citrato, 500 mM Arginina (2 mg/ml)	2,00	2,01	0,01
30 mM Citrato, 500 mM Arginina (8 mg/ml)	8,05	7,95	-0,10
50 mM Citrato, 100 mM Arginina (5 mg/ml)	5,07	5,01	-0,06
50 mM Citrato, 300 mM Arginina (2 mg/ml)	1,99	2,00	0,01
50 mM Citrato, 300 mM Arginina (8 mg/ml)	8,17	8,17	0,00
50 mM Citrato, 500 mM Arginina (5 mg/ml)	4,89	4,93	0,04
10 mM Succinato, 100 mM Arginina (5 mg/ml)	5,25	5,06	-0,19
10 mM Succinato, 300 mM Arginina (2 mg/ml)	1,94	1,88	-0,06
10 mM Succinato, 300 mM Arginina (8 mg/ml)	8,21	8,72	0,51
10 mM Succinato, 500 mM Arginina (5 mg/ml)	5,03	4,91	-0,12
30 mM Succinato, 100 mM Arginina (2 mg/ml)	2,04	1,75	-0,29
30 mM Succinato, 100 mM Arginina (8 mg/ml)	7,97	7,79	-0,18
30 mM Succinato, 300 mM Arginina (5 mg/ml) Vial A	4,92	4,77	-0,15
30 mM Succinato, 300 mM Arginina (5 mg/ml) Vial B	4,87	4,85	-0,02
30 mM Succinato, 300 mM Arginina (5 mg/ml) Vial C	4,97	4,80	-0,17
30 mM Succinato, 500 mM Arginina (2 mg/ml)	1,90	1,86	-0,04
30 mM Succinato, 500 mM Arginina (8 mg/ml)	7,81	7,69	-0,12
50 mM Succinato, 100 mM Arginina (5 mg/ml)	4,80	4,94	0,14
50 mM Succinato, 300 mM Arginina (2 mg/ml)	1,86	1,84	-0,02
50 mM Succinato, 300 mM Arginina (8 mg/ml)	7,88	7,76	-0,12

(continuación)

Muestra	Concentración de Proteína (mg/ml)		
	Inicial	40°C durante 1Día	Diferencia
50 mM Succinato, 500 mM Arginina (5 mg/ml)	4,91	4,92	0,00
10 mM Fosfato, 150 mM NaCl, 0,0033% Tween-20 (p/v) (5 mg/ml) ⁴	5,05	5,02	-0,02

Se pueden analizar los cambios del pH para evaluar la estabilidad de pH de las muestras. Todos los pH de las muestras pueden estar en el intervalo de 6,0 - 6,3. La Tabla 7 muestra los valores del pH y la diferencia desde el tiempo 0. El pH de las muestras es estable para la duración completa del estudio DOE nº 1.

Tabla 7. Resumen del pH a partir del estudio DOE nº 1 (Inicial y 1 día a 40 °C)

Muestra	pH		
	Inicial	40°C durante 1Día	Diferencia
10 mM Citrato, 100 mM Arginina (5 mg/ml)	6,14	6,16	0,02
10 mM Citrato, 300 mM Arginina (2 mg/ml)	6,10	6,12	0,02
10 mM Citrato, 300 mM Arginina (8 mg/ml)	6,08	6,10	0,02
10 mM Citrato, 500 mM Arginina (5 mg/ml)	6,25	6,27	0,02
30 mM Citrato, 100 mM Arginina (2 mg/ml)	6,15	6,19	0,04
30 mM Citrato, 100 mM Arginina (8 mg/ml)	6,13	6,19	0,06
30 mM Citrato, 300 mM Arginina (5 mg/ml) Vial A	6,19	6,21	0,02
30 mM Citrato, 300 mM Arginina (5 mg/ml) Vial B	6,31	6,21	-0,10
30 mM Citrato, 300 mM Arginina (5 mg/ml) Vial C	6,24	6,21	-0,03
30 mM Citrato, 500 mM Arginina (2 mg/ML)	6,16	6,16	0,00
30 mM Citrato, 500 mM Arginina (8 mg/ml)	6,12	6,15	0,03
50 mM Citrato, 100 mM Arginina (5 mg/ml)	6,28	6,22	-0,06
50 mM Citrato, 300 mM Arginina (2 mg/ml)	6,19	6,18	-0,01
50 mM Citrato, 300 mM Arginina (8 mg/ml)	6,19	6,16	-0,03
50 mM Citrato, 500 mM Arginina (5 mg/ml)	6,19	6,15	-0,04
10 mM Succinato, 100 mM Arginina (5 mg/ml)	6,11	6,16	0,05
10 mM Succinato, 300 mM Arginina (2 mg/ml)	6,05	6,08	0,03
10 mM Succinato, 300 mM Arginina (8 mg/ml)	6,04	6,05	0,01
10 mM Succinato, 500 mM Arginina (5 mg/ml)	6,17	6,17	0,00
30 mM Succinato, 100 mM Arginina (2 mg/ml)	6,25	6,23	-0,02
30 mM Succinato, 100 mM Arginina (8 mg/ml)	6,25	6,23	-0,02
30 mM Succinato, 300 mM Arginina (5 mg/ml) Vial A	6,31	6,31	0,00

(continuación)

Muestra	pH		
	Inicial	40°C durante 1Día	Diferencia
30 mM Succinato, 300 mM Arginina (5 mg/ml) Vial B	6,30	6,30	0,00
30 mM Succinato, 300 mM Arginina (5 mg/ml) Vial C	6,30	6,29	-0,01
30 mM Succinato, 500 mM Arginina (2 mg/ml)	6,19	6,19	0,00
30 mM Succinato, 500 mM Arginina (8 mg/ml)	6,19	6,18	-0,01
50 mM Succinato, 100 mM Arginina (5 mg/ml)	6,18	6,17	-0,01
50 mM Succinato, 300 mM Arginina (2 mg/ml)	6,22	6,19	-0,03
50 mM Succinato, 300 mM Arginina (8 mg/ml)	6,21	6,21	0,00
50 mM Succinato, 500 mM Arginina (5 mg/ml)	6,22	6,21	-0,01
10 mM Fosfato, 150 mM NaCl (5 mg/ml)	6,11	6,10	-0,01

Los cambios en el nivel de agregados, monómeros, y despegilación en la SEC se pueden analizar para evaluar la estabilidad proteica. Las Tablas 8, 9 y 10 muestran las composiciones de agregación, monómeros, y despegilación en cada composición de muestras, respectivamente.

5

Tabla 8. Resultados de la agregación en la SEC del estudio DOE nº 1

Muestra	% Agregado para el Citrato			% Agregado para el Succinato		
	Inicial	40°C durante 1 Día	Diferencia	Inicial	40°C durante 1 Día	Diferencia
Grupo NBJ0801-04-04 para Pre-Diálisis (Tampón)	1,1	N/A		0,7	N/A	
10 mM Tampón, 100 mM Arginina (5 mg/ml)	1,1	1,5	0,4	1,3	2,9	1,6
10 mM Tampón, 300 mM Arginina (2 mg/ml)	1,0	1,0	0,0	1,5	1,4	-0,1
10 mM Tampón, 300 mM Arginina (8 mg/ml)	1,0	1,2	0,2	1,2	1,4	0,3
10 mM Tampón, 500 mM Arginina (5 mg/ml)	1,1	1,3	0,2	1,1	1,4	0,2
30 mM Tampón, 100 mM Arginina (2 mg/ml)	1,2	1,3	0,0	1,6	1,7	0,1
30 mM Tampón, 100 mM Arginina (8 mg/ml)	1,1	1,5	0,4	1,2	2,6	1,3
30 mM Tampón, 300 mM Arginina (5 mg/ml) Vial A	1,1	1,1	0,0	1,4	1,4	0,0
30 mM Tampón, 300 mM Arginina (5 mg/ml) Vial B	1,0	1,2	0,2	1,2	1,5	0,3

(continuación)

Muestra	% Agregado para el Citrato			% Agregado para el Succinato		
	Inicial	40°C durante 1 Día	Diferencia	Inicial	40°C durante 1 Día	Diferencia
30 mM Tampón, 300 mM Arginina (5 mg/ml) Vial C	1,0	1,1	0,1	1,2	1,4	0,2
30 mM Tampón, 500 mM Arginina (2 mg/ml)	1,1	1,2	0,1	1,9	1,4	-0,5
30 mM Tampón, 500 mM Arginina (8 mg/ml)	1,1	1,3	0,2	1,3	1,4	0,1
50 mM Tampón, 100 mM Arginina (5 mg/ml)	1,3	1,5	0,2	1,5	2,7	1,3
50 mM Tampón, 300 mM Arginina (2 mg/ml)	1,2	1,1	-0,1	1,6	1,4	-0,2
50 mM Tampón, 300 mM Arginina (8 mg/ml)	1,1	1,4	0,3	1,3	1,8	0,5
50 mM Tampón, 500 mM Arginina (5 mg/ml)	1,4	1,2	-0,2	1,4	1,4	0,0
10 mM Fosfato, 150 mM NaCl, 0,0033% Tween-20 (5 mg/ml)	Inicial = 0,8		40°C durante 1 Día = 3,7		Diferencia = 2,8	

Tabla 9. Resultados de monómeros de la SEC del estudio DOE nº 1

Muestra	% Monómeros para el Citrato			% Monómeros para el Succinato		
	Inicial	40°C durante 1 Día	Diferencia	Inicial	40°C durante 1 Día	Diferencia
Grupo NBJ0801-04-04 para Pre-Diálisis (Tampón)	98,7	N/A		99,0	N/A	
10 mM Tampón, 100 mM Arginina (5 mg/ml)	98,8	98,4	-0,4	97,9	96,6	-1,4
10 mM Tampón, 300 mM Arginina (2 mg/ml)	98,8	98,7	-0,1	97,9	98,0	0,2
10 mM Tampón, 300 mM Arginina (8 mg/ml)	98,9	98,6	-0,3	97,8	97,7	-0,1
10 mM Tampón, 500 mM Arginina (5 mg/ml)	98,7	98,4	-0,3	97,9	97,8	-0,1
30 mM Tampón, 100 mM Arginina (2 mg/ml)	98,6	98,5	-0,1	98,0	97,9	-0,1
30 mM Tampón, 100 mM Arginina (8 mg/ml)	98,7	98,3	-0,4	98,1	96,9	-1,2
30 mM Tampón, 300 mM Arginina (5 mg/ml) Vial A	98,7	98,6	-0,1	98,0	98,1	0,1
30 mM Tampón, 300 mM Arginina (5 mg/ml) Vial B	98,8	98,5	-0,2	98,2	98,0	-0,2
30 mM Tampón, 300 mM Arginina (5 mg/ml) Vial C	98,8	98,6	-0,2	98,2	98,1	-0,1

(continuación)

Muestra	% Monómeros para el Citrato			% Monómeros para el Succinato		
	Inicial	40°C durante 1 Día	Diferencia	Inicial	40°C durante 1 Día	Diferencia
30 mM Tampón, 500 mM Arginina (2 mg/ml)	98,7	98,5	-0,2	97,6	98,1	0,4
30 mM Tampón, 500 mM Arginina (8 mg/ml)	98,7	98,4	-0,3	98,0	98,0	0,0
50 mM Tampón, 100 mM Arginina (5 mg/ml)	98,5	98,3	-0,2	98,1	96,9	-1,2
50 mM Tampón, 300 mM Arginina (2 mg/ml)	98,6	98,6	0,0	97,9	98,2	0,2
50 mM Tampón, 300 mM Arginina (8 mg/ml)	98,7	98,3	-0,3	98,1	97,7	-0,4
50 mM Tampón, 500 mM Arginina (5 mg/ml)	98,4	98,5	0,1	98,0	98,0	0,0
10 mM Fosfato, 150 mM NaCl, 0,0033% Tween-20 (5 mg/ml)	Inicial = 98,1		40°C durante 1 Día = 95,6		Diferencia = -2,5	

Tabla 10. Resultados de la SEC de despegilación del estudio DOE nº 1

Muestra	% Despegilación para el Citrato			% Despegilación para el Succinato		
	Inicial	40°C durante 1 Día	Diferencia	Inicial	40°C durante 1 Día	Diferencia
Grupo NBJ0801-04-04 para Pre-Diálisis (Tampón)	0,2	N/A		0,3	N/A	
10 mM Tampón, 100 mM Arginina (5 mg/ml)	0,2	0,1	0,0	0,8	0,6	-0,3
10 mM Tampón, 300 mM Arginina (2 mg/ml)	0,2	0,3	0,1	0,6	0,6	0,0
10 mM Tampón, 300 mM Arginina (8 mg/ml)	0,2	0,3	0,1	1,0	0,8	-0,2
10 mM Tampón, 500 mM Arginina (5 mg/ml)	0,2	0,3	0,1	1,0	0,8	-0,1
30 mM Tampón, 100 mM Arginina (2 mg/ml)	0,2	0,2	0,0	0,4	0,4	0,0
30 mM Tampón, 100 mM Arginina (8 mg/ml)	0,2	0,2	0,0	0,6	0,5	-0,1
30 mM Tampón, 300 mM Arginina (5 mg/ml) Vial A	0,2	0,3	0,1	0,6	0,5	-0,1
30 mM Tampón, 300 mM Arginina (5 mg/ml) Vial B	0,2	0,3	0,1	0,6	0,5	-0,1
30 mM Tampón, 300 mM Arginina (5 mg/ml) Vial C	0,2	0,2	0,0	0,6	0,5	0,0
30 mM Tampón, 500 mM Arginina (2 mg/ml)	0,2	0,3	0,1	0,5	0,5	0,0

(continuación)

Muestra	% Despegilación para el Citrato			% Despegilación para el Succinato		
	Inicial	40°C durante 1 Día	Diferencia	Inicial	40°C durante 1 Día	Diferencia
30 mM Tampón, 500 mM Arginina (8 mg/ml)	0,2	0,3	0,1	0,7	0,7	-0,1
50 mM Tampón, 100 mM Arginina (5 mg/ml)	0,2	0,2	0,0	0,4	0,4	-0,1
50 mM Tampón, 300 mM Arginina (2 mg/ml)	0,2	0,3	0,1	0,4	0,4	0,0
50 mM Tampón, 300 mM Arginina (8 mg/ml)	0,2	0,2	0,0	0,6	0,6	-0,1
50 mM Tampón, 500 mM Arginina (5 mg/ml)	0,2	0,3	0,1	0,6	0,6	0,0
10 mM Fosfato, 150 mM NaCl, 0,0033% Tween-20 (5 mg/ml)	Inicial = 1,1		40°C durante 1 Día = 0,7		Diferencia = -0,3	

Los resultados de la SEC indican que el nivel de agregados en las muestras con citrato está relativamente sin cambios. Las muestras con succinato también tienen bajos niveles de agregados excepto en las muestras con 100 mM de arginina, sugiriendo que los tampones basados en succinato necesitarían más de 100 mM de arginina para mantener una agregación proteica baja. Las condiciones de control (10 mM de Fosfato, 150 mM de NaCl, y 0,0033% (p/v) de monolaurato de sorbitán polioxietileno (20) a pH 6 y a 5 mg/ml) tiene un 3,7% de agregados tras una día de incubación a 40 °C (véase la Tabla 8).

La despegilación es otra ruta de degradación proteica. La Tabla 10 muestra los resultados de la SEC para los productos despegilados e indica que el nivel de despegilación en las muestras con succinato es mayor (0,4%-0,8%) que el de las muestras con citrato ($\leq 0,3\%$). El nivel de despegilación en el control con fosfato es mayor que en todas las muestras con formulación de citrato y es ligeramente mayor que la mayoría de las formulaciones de succinato.

Mientras que los resultados de la SEC de las muestras con citrato que se incubaron a 40 °C durante 1 día tienen agregados mínimos, un subgrupo de las muestras DOE nº 1 se pueden incubar a 25 °C durante 28 días. Las siguientes condiciones de muestra se pueden analizar por SEC:

1. 30 mM Citrato, 100 mM Arginina a 2 mg/mL
2. 30 mM Citrato, 500 mM Arginina a 2 mg/mL
3. 30 mM Citrato, 100 mM Arginina a 8 mg/mL
4. 30 mM Citrato, 500 mM Arginina a 8 mg/mL
5. 30 mM Citrato, 300 mM Arginina a 5 mg/mL

La Tabla 11 muestra los resultados de la SEC del experimento de 28 días. Además, se puede llevar a cabo el análisis por RP-HPLC en las muestras incubadas durante 28 días para asegurar la falta de degradación del producto. La Tabla 12 muestra estos resultados.

Tabla 11. Resultados de la SEC del estudio DOE nº 1 incubando 28 días a 25 °C

Muestra	Incubación de 28 Días a 25°C		
	% Med. Agregado	% Med. PEG-bGCSF	% Med. bGCSF
100 mM Arginina 2 mg/ml	1,3	98,1	0,6
100 mM Arginina 8 mg/ml	1,6	98,0	0,4
300 mM Arginina 5 mg/ml Vial A	1,4	98,0	0,7
300 mM Arginina 5 mg/ml Vial B	1,3	98,1	0,6
300 mM Arginina 5 mg/ml Vial C	1,3	98,0	0,7
500 mM Arginina 2 mg/ml	1,4	97,8	0,8
500 mM Arginina 8 mg/ml	1,5	97,7	0,7

Tabla 12. Resultados de la RP-HPLC del estudio DOE nº 1 incubando 28 días a 25 °C

Muestra	% Monómero		
	Inicial	28 Días a 25°C	Diferencia
100 mM Arginina 2 mg/ml	97,3	97,8	0,4
100 mM Arginina 8 mg/ml	97,0	97,4	0,4
300 mM Arginina 5 mg/ml Vial A	97,3	97,3	0,0
300 mM Arginina 5 mg/ml Vial B	97,1	95,2	-2,0
300 mM Arginina 5 mg/ml Vial C	97,1	97,4	0,3
500 mM Arginina 2 mg/ml	97,2	97,0	-0,2
500 mM Arginina 8 mg/ml	97,2	97,2	0,0

5 Ejemplo 4

Evaluación de compatibilidad del contraíón y la jeringa

Se puede evaluar una comparación de cloruro y sulfato como contraíones para la arginina. La condición de la muestra puede ser 30 mM de citrato y 300 mM de arginina a 5 mg/ml (pH 6). Además, se puede comparar la compatibilidad de producto entre la jeringa de polipropileno MONOJET de 3 ml para contener el fármaco en comparación con los viales de cristal de 1 ml. Se puede preparar un tampón de 30 mM de citrato, 300 mM de arginina pH 6 (Cloruro) utilizando citrato sódico y arginina-HCl, y se titula la solución con HCl 6 N. El tampón 30 mM de citrato, 300 mM de arginina pH 6 (Sulfato) se puede preparar utilizando ácido cítrico monohidrato, citrato sódico, y arginina básica, y la solución se puede titular con ácido sulfúrico concentrado. El bGCSF-T133-20K PEG se puede dializar en los dos tampones. Las muestras se pueden analizar por SEC en un tiempo cero. Un grupo de muestras se pueden colocar en un vial de liofilización de 1 ml y un segundo grupo en jeringas de 3 ml antes de la incubación a 40 °C hasta por 3 días.

La Tabla 13 muestra los resultados de la SEC. Los resultados de la SEC indican que la formación de agregados es dos a tres veces mayor en las muestras almacenadas en jeringas que en viales de cristal. La despegilación del producto permanece igual que en las muestras de tiempo cero. Para ambos contraíones, las muestras en viales de cristal tienen un cambio mínimo en los agregados tras 3 días a 40 °C. El cloruro se podría utilizar en vez del sulfato como contraíón sin impacto en la formación de agregados.

Tabla 13. Resultados de la SEC de la evaluación del contra ion y comparación de compatibilidad de la jeringa

Muestra	Inicial			1 día de Incubación a 40°C			2 días de Incubación a 40°C			3 días de Incubación a 40°C		
	% Agregado	% PEG-bGCSF	% bGCSF	% Agregado	% PEG-bGCSF	% bGCSF	% Agregado	% PEG-bGCSF	% bGCSF	% Agregado	% PEG-bGCSF	% bGCSF
Grupo pre-dializado	0,5	99,2	0,3	N/A								
Cloruro (Vial de Cristal)	1,2	98,5	0,3	1,2	98,5	0,4	1,2	98,3	0,4	1,2	98,2	0,7
Sulfato (Vial de Cristal)	1,6	98,1	0,3	1,2	98,5	0,3	1,2	98,3	0,5	1,4	97,9	0,6
Cloruro (Jeringa)	1,2	98,5	0,3	2,2	97,5	0,3	4,0	95,5	0,4	4,9	94,6	0,5
Sulfato (Jeringa)	1,6	98,1	0,3	2,1	97,5	0,3	3,5	96,1	0,4	4,5	95,0	0,5

Ejemplo 5Factorial completo a 2 niveles, tres parámetros (DOE nº 2)

En segundo estudio DOE se puede llevar a cabo para evaluar el efecto del pH, concentración de arginina, y concentración de proteína en tampón citrato. La Tabla 14 muestra las condiciones de formulación que se utilizan en el DOE nº 2.

Tabla 14. Condiciones de formulación

Muestra Nº	Concentración Arginina (mM)	pH	Concentración Producto (mg/ml)
1	200	5,0	2
2	200	5,0	8
3	200	6,0	2
4	200	6,0	8
5	250	5,5	5
6	250	5,5	5
7	250	5,5	5
8	300	5,0	8
9	300	5,0	2
10	300	6,0	8
11	300	6,0	2

El bGCSF-T133-20K PEG se puede dializar en 5 condiciones de tampón. Las muestras 1 y 2 se pueden dializar en un tampón que contiene 30 mM de citrato y 200 mM de arginina a pH 5,0. Las muestras 3 y 4 se pueden dializar en un tampón que contiene 30 mM de citrato y 200 mM de arginina a pH 5,0. Las muestras 5 y 6 se pueden dializar en un tampón que contiene 30 mM de citrato y 250 mM de arginina a pH 6,0. Las muestras 7 y 8 se pueden dializar en un tampón que contiene 30 mM de citrato y 300 mM de arginina a pH 6,0. Las muestras 9 y 10 se pueden dializar en un tampón que contiene 30 mM de citrato y 300 mM de arginina a pH 5,5. Cada muestra post-dializada se puede ajustar a la concentración de producto diana final y luego se divide en 2 x 1 alícuotas en viales de cristal de liofilización para formar dos grupos de muestras: un grupo se puede almacenar a 2-8 °C como control y un segundo grupo que se puede almacenar a 40 °C durante tres días.

La Tabla 15 muestra los resultados de la SEC. El cambio en agregados es entre -0,1% y 2,1%. Los mayores agregados se correlacionan fuertemente con la concentración más alta de producto. La delta de despegilación está entre el 0,1% y el 0,8%. Se correlaciona una despegilación ligeramente mayor con una concentración del producto baja a pH bajo. Según disminuye el pH, aumenta la despegilación, y esta tendencia es consistente con las observaciones históricas en los estudios de pre-formulación.

Tabla 15. Resumen de los resultados de la SEC para el estudio DOE nº 2

Ejecución Nº	% Agregado			% Monómero			% Despegilación		
	Inicial	40°C durante 3 días	Diferencia	Inicial	40°C durante 3 días	Diferencia	Inicial	40°C durante 3 días	Diferencia
1	1,0	1,2	0,2	98,7	97,8	-0,9	0,3	1,0	0,7
2	0,8	2,8	2,0	98,9	96,6	-2,3	0,3	0,7	0,4
3	1,4	1,3	-0,1	98,4	98,3	-0,1	0,2	0,4	0,2
4	0,9	2,6	1,7	98,8	97,1	-1,8	0,2	0,3	0,1

(continuación)

Ejecución N°	% Agregado			% Monómero			% Despegilación		
	Inicial	40°C durante 3 días	Diferencia	Inicial	40°C durante 3 días	Diferencia	Inicial	40°C durante 3 días	Diferencia
5	0,9	2,0	1,1	98,8	97,4	-1,4	0,3	0,6	0,3
6	1,0	2,0	1,0	98,7	97,4	-1,3	0,3	0,6	0,3
7	1,0	1,8	0,8	98,8	97,7	-1,1	0,3	0,6	0,3
8	1,1	1,2	0,1	98,6	97,7	-0,9	0,3	1,1	0,8
9	0,7	2,8	2,1	99,0	96,4	-2,6	0,3	0,8	0,5
10	1,2	1,2	0,0	98,6	98,4	-0,2	0,2	0,5	0,2
11	0,9	2,2	1,3	98,8	97,3	-1,5	0,3	0,4	0,1

Ejemplo 6Estudio de Agitación

- 5 Se puede llevar a cabo un estudio de agitación forzada para evaluar la estabilidad proteica en las formulaciones. Las muestras se pueden preparar dializando bGCSF-T133-20K PEG (16,6 mg/ml de proteína en 10 mM de acetato sódico, 5% de sorbitol pH 4,0) contra 30 mM de Citrato y 250 mM de Arginina a pH 6,0. El grupo se puede entonces filtrar a través de un filtro de 0,22 micrómetros y luego someterse a agitación forzada en un vaso de precipitados mezclando a 60 rpm utilizando un agitador magnético durante dos horas a temperatura ambiente. Las muestras se
- 10 pueden tomar cada 30 minutos.

Todas las muestras estaban transparentes, sin color, y libres de partículas visibles en todos los puntos de tiempo. La medición de la concentración proteica, absorbancia a 550 nm, y pH para cada punto de tiempo se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Resumen de los resultados de la concentración proteica, A₅₅₀, y pH del estudio de agitación (mezclado)

Muestra	Ensayo A280 nm			Absorbancia A550	pH
	Concentración proteica (mg/ml)	Desv. Estd. (%)	RSD (%)		
T ₀	4,9	0,03	0,60%	0,00942	6,0
T _{30 min} Control	5,0	0,01	0,30%	-0,00015	6,0
T _{30 min} Agitado	4,9	0,04	0,70%	0,00972	6,0
T _{60 min} Control	4,9	0,03	0,60%	0,00407	6,0
T _{60 min} Agitado	4,9	0,02	0,40%	0,03547	6,0
T _{90 min} Control	5,0	0,05	1,00%	0,09031	6,0
T _{90 min} Agitado	4,9	0,03	0,60%	0,08798	6,0
T _{120 min} Control	5,0	0,03	0,60%	0,08761	6,0
T _{120 min} Agitado	4,9	0,03	0,60%	0,08775	6,0

La concentración proteica permanece estable a lo largo de la duración del mezclado. El pH permanece constante a lo largo del experimento. La composición del producto por SEC también es constante a lo largo del estudio, como se

muestra en la Tabla 17. En general, los resultados de este estudio indican que la proteína es estable durante toda la duración de la agitación forzada,

Tabla 17. Resumen de los resultados de la SEC del estudio de agitación (Mezclado)

Muestra	% Agregado	% PEG-bGCSF	% bGCSF
T0	1,6	98,1	0,3
T30 min Control	1,6	98,2	0,3
T30 min Agitado	1,6	98,2	0,3
T60 min Control	1,6	98,1	0,3
T60 min Agitado	1,6	98,2	0,3
T90 min Control	1,6	98,2	0,3
T90 min Agitado	1,6	98,2	0,3
T120 min Control	1,6	98,1	0,3
T120 min Agitado	1,6	98,2	0,3

5 Ejemplo 7

Estudio de congelación-descongelación

Se puede llevar a cabo un estudio de congelación-descongelación para determinar la concentración proteica y el pH de varias muestras. La proteína en las muestras se puede someter hasta cinco ciclos de congelación y descongelación. Las muestras se pueden filtrar a través de filtros de 0,22 micrómetros y dispensarse en viales de 15 ml. Una alícuota se puede dejar a un lado como control. Para las restantes tres alícuotas, cada ciclo de congelación-descongelación podría consistir en la congelación de la solución proteica durante una hora a -75 ± 5 °C y descongelar a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora hasta que no se observe hielo. El vial de la muestra se puede girar suavemente tres veces para mezclar la muestra. Una alícuota se puede dejar a un lado tras el primer, segundo, y quinto ciclos de congelación-descongelación para su ensayo.

Todas las muestras estaban transparentes, sin color, y libres de partículas visibles en todos los puntos de tiempo. La medición de la concentración proteica, absorbancia a 550 nm, y pH para cada punto de tiempo se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Resumen de los resultados de concentración proteica, A_{550} , y pH del estudio de congelación-descongelación

Muestra	Ensayo A280 nm			Absorbancia A550	pH
	Concentración proteica (mg/ml)	Desv. Estd. (%)	RSD (%)		
Ciclo 0	20,6	0,5	2,20%	0,11563	5,9
Ciclo 1	21,9	1,4	6,40%	0,09471	5,9
Ciclo 2	22,6	0,3	1,40%	0,12685	5,9
Ciclo 5	21,3	1,0	4,60%	0,13357	5,9

La concentración proteica permanecía estable tras cada ciclo de congelación-descongelación. Además, el pH permanece constante a lo largo de los cinco ciclos de congelación-descongelación. La composición del producto por SEC es similar a lo largo de todos los puntos de tiempo y se muestra en la tabla 19.

Tabla 19. Resumen de los resultados de la SEC del estudio de congelación-descongelación

Muestra	% Agregado	% PEG-bGCSF	% bGCSF
Ciclo 0	1,6	98,1	0,3
Ciclo 1	1,5	98,1	0,4
Ciclo 2	1,6	98,0	0,4
Ciclo 5	1,5	98,1	0,4

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ELI LILLY & COMPANY

5 <120> FORMULACIONES PARA EL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE GRANULOCITOS BOVINO Y SUS VARIANTES

<130>X18988

10 <150> 61/385.629

<151> 23-09-2010

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.5

15

<210> 1

<211> 174

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

20

<400> 1

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys
1 5 10 15

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu Gln
20 25 30

Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Met
35 40 45

Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser Cys
50 55 60

Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His Gly
65 70 75 80

Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile Ser
85 90 95

Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr Asp
100 105 110

Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala Pro
115 120 125

Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala Phe
130 135 140

Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg Phe
145 150 155 160

Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
165 170

<210>2

<211> 175

<212> PRT

5 <213> *Bos taurus*

<400>2

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
1 5 10 15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu
20 25 30

Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
35 40 45

Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser
50 55 60

Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His
65 70 75 80

Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile
85 90 95

Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr
100 105 110

Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala
115 120 125

Pro Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala
130 135 140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg
145 150 155 160

Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
165 170 175

<210>3

<211> 175

<212> PRT

5 <213> *Bos taurus*

<220>

<221 > misc_feature

10 <222> (9)..(9)

<223> en el que Xaa es para-acetilfenilalanina (pAF)

<400> 3

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Xaa Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
1 5 10 15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu
20 25 30

Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
35 40 45

Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser
50 55 60

Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His
65 70 75 80

Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile
85 90 95

Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr
100 105 110

Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala
115 120 125

Pro Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala
130 135 140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg
145 150 155 160

Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
165 170 175

<210>4

<211> 175

5 <212> PRT

<213> *Bos taurus*

<220>

<221 > misc_feature

10 <222> (63)..(63)

<223> en el que Xaa es para-acetilfenilalanina (pAF)

<400> 4

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
1 5 10 15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu
20 25 30

Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
35 40 45

Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Xaa Ser
50 55 60

Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His
65 70 75 80

Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile
85 90 95

Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr
100 105 110

Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala
115 120 125

Pro Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala
130 135 140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg
145 150 155 160

Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
165 170 175

<210>5

<211> 175

5 <212> PRT

<213> *Bos taurus*

<220>

<221 > misc_feature

10 <222> (70)..(70)

<223> en el que Xaa es para-acetilfenilalanina (pAF)

<400>5

```

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
1           5           10           15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu
          20           25           30

Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
          35           40           45

Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser
50           55           60

Cys Ser Ser Gln Ser Xaa Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His
65           70           75           80

Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile
          85           90           95

Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr
          100          105          110

Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala
          115          120          125

Pro Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala
          130          135          140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg
145           150           155           160

Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
          165          170          175

```

<210>6

<211> 175

5 <212> PRT

<213> *Bos taurus*

<220>

<221 > misc_feature

10 <222> (126)..(126)

<223> en el que Xaa es para-acetilfenilalanina (pAF)

<400>6

```

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
1           5           10           15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu
          20           25           30

Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
          35           40           45

Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser
50           55           60

Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His
65           70           75           80

Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile
          85           90           95

Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr
          100          105          110

Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Xaa Ala Ala
          115          120          125

Pro Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala
130           135          140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg
145           150          155          160

Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
          165          170          175

```

<210>7

<211> 175

5 <212> PRT

<213> *Bos taurus*

<220>

<221 > misc_feature

10 <222> (134)..(134)

<223> en el que Xaa es para-acetilfenilalanina (pAF)

<400> 7

```

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
1          5          10          15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu
          20          25          30

Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
          35          40          45

Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser
50          55          60

Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His
65          70          75          80

Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile
          85          90          95

Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr
          100          105          110

Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala
          115          120          125

Pro Ala Val Gln Pro Xaa Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala
          130          135          140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg
145          150          155          160

Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
          165          170          175

```

<210>8

<211> 175

5 <212> PRT

<213> *Bos taurus*

<220>

<221 > misc_feature

10 <222> (137)..(137)

<223> en el que Xaa es para-acetilfenilalanina (pAF)

<400>8

Met	Thr	Pro	Leu	Gly	Pro	Ala	Arg	Ser	Leu	Pro	Gln	Ser	Phe	Leu	Leu
1				5					10					15	
Lys	Cys	Leu	Glu	Gln	Val	Arg	Lys	Ile	Gln	Ala	Asp	Gly	Ala	Glu	Leu
			20					25					30		
Gln	Glu	Arg	Leu	Cys	Ala	Ala	His	Lys	Leu	Cys	His	Pro	Glu	Glu	Leu
		35					40					45			
Met	Leu	Leu	Arg	His	Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Gln	Ala	Pro	Leu	Ser	Ser
	50					55					60				
Cys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Gln	Leu	Thr	Ser	Cys	Leu	Asn	Gln	Leu	His
65					70					75				80	
Gly	Gly	Leu	Phe	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Ala	Gly	Ile
				85					90					95	
Ser	Pro	Glu	Leu	Ala	Pro	Thr	Leu	Asp	Thr	Leu	Gln	Leu	Asp	Val	Thr
			100					105					110		
Asp	Phe	Ala	Thr	Asn	Ile	Trp	Leu	Gln	Met	Glu	Asp	Leu	Gly	Ala	Ala
		115					120					125			
Pro	Ala	Val	Gln	Pro	Thr	Gln	Gly	Xaa	Met	Pro	Thr	Phe	Thr	Ser	Ala
	130						135					140			
Phe	Gln	Arg	Arg	Ala	Gly	Gly	Val	Leu	Val	Ala	Ser	Gln	Leu	His	Arg
145					150					155					160
	Phe	Leu	Glu	Leu	Ala	Tyr	Arg	Gly	Leu	Arg	Tyr	Leu	Ala	Glu	Pro
				165						170				175	

<210>9

<211> 175

5 <212> PRT

<213> *Bos taurus*

<220>

<221 > misc_feature

10 <222> (9)..(9)

<223> en el que Xaa es para-acetilfenilalanina (pAF) unida a un resto de poli(etilenglicol)

<400>9

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Xaa Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
1 5 10 15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu
20 25 30

Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
35 40 45

Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser
50 55 60

Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His
65 70 75 80

Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile
85 90 95

Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr
100 105 110

Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala
115 120 125

Pro Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala
130 135 140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg
145 150 155 160

Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
165 170 175

<210> 10

<211> 175

5 <212> PRT

<213> *Bos taurus*

<220>

<221 > misc_feature

10 <222> (63)..(63)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (64)..(64)

<223> en el que Xaa es para-acetilfenilalanina (pAF) unida a un resto de poli(etilenglicol)

5

<400> 10

```

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
1          5          10          15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu
          20          25          30

Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
          35          40          45

Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Xaa Ser
50          55          60

Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His
65          70          75          80

Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile
          85          90          95

Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr
          100          105          110

Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala
          115          120          125

Pro Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala
          130          135          140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg
145          150          155          160

Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
          165          170          175

```

<210> 11

<211> 175

10

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

<220>

<221> misc_feature

<222> (70)..(70)

<223> en el que Xaa es para-acetilfenilalanina (pAF) unida a un resto de poli(etilenglicol)

5

<400> 11

```

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
 1              5              10              15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu
      20              25              30

Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
      35              40              45

Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser
 50              55              60

Cys Ser Ser Gln Ser Xaa Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His
65              70              75              80

Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile
      85              90              95

Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr
      100              105              110

Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala
      115              120              125

Pro Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala
      130              135              140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg
145              150              155              160

Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
      165              170              175

```

<210> 12

<211> 175

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (126)..(126)

<223> en el que Xaa es para-acetilfenilalanina (pAF) unida a un resto de poli(etilenglicol)

5

<400> 12

```

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
 1          5          10          15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu
      20          25          30

Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
      35          40          45

Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser
 50          55          60

Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His
65          70          75          80

Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile
      85          90          95

Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr
      100          105          110

Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Xaa Ala Ala
      115          120          125

Pro Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala
      130          135          140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg
145          150          155          160

Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
      165          170          175

```

<210> 13

<211> 175

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

<220>

10

<221> misc_feature

<222> (134)..(134)

<223> en el que Xaa es para-acetilfenilalanina (pAF) unida a un resto de poli(etilenglicol)

5

<400> 13

```

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
 1              5              10              15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu
      20              25              30

Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
      35              40              45

Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser
 50              55              60

Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His
 65              70              75              80

Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile
      85              90              95

Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr
      100              105              110

Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala
      115              120              125

Pro Ala Val Gln Pro Xaa Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala
      130              135              140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg
 145              150              155              160

Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
      165              170              175

```

<210> 14

10

<211> 175

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

<220>

<221 > misc_feature

<222> (137)..(137)

<223> en el que Xaa es para-acetilfenilalanina (pAF) unida a un resto de poli(etilenglicol)

5

<400> 14

```

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
 1              5              10              15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu
      20              25              30

Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
      35              40              45

Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser
 50              55              60

Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His
65              70              75              80

Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile
      85              90              95

Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr
      100              105              110

Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala
      115              120              125

Pro Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Xaa Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala
      130              135              140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg
145              150              155              160

Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
      165              170              175

```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación acuosa estable que comprende bG-CSF-T133pKF-20K PEG, un tampón citrato o succinato, arginina, y opcionalmente un contraión para la arginina, y en la que dicha formulación contiene menos del 0,033% de un tensioactivo polisorbato.
2. La formulación de la reivindicación 1 en la que el bG-CSF-T133 pKF -20K PEG está presente en una cantidad de entre 0,5 y 12 gramos/litro, el tampón es citrato y dicho tampón de citrato tiene una molaridad de aproximadamente 30 mM, la arginina tiene una molaridad de aproximadamente 250 mM, y en la que la formulación tiene un valor del pH de aproximadamente 6,0.
- 10 3. Una formulación acuosa estable que consiste esencialmente en bG-CSF-T133 pKF -20K PEG, un tampón citrato o succinato, arginina, y opcionalmente un contraión para arginina.
- 15 4. La formulación de la reivindicación 3 en la que el bG-CSF-T133 pKF -20K PEG está presente en una cantidad de entre 0,5 y 12 gramos/litro, el tampón es citrato y dicho tampón de citrato tiene una molaridad de aproximadamente 30 mM, la arginina tiene una molaridad de aproximadamente 250 mM, y en la que la formulación tiene un valor del pH de 6,0.
5. Una formulación acuosa estable que consiste esencialmente en bG-CSF-T133 pKF -20K PEG, un tampón citrato en la que el tampón citrato tiene una molaridad de aproximadamente 30 mM, arginina en la que la arginina tiene una molaridad de aproximadamente 250 mM, y opcionalmente un contraión para la arginina.
- 20 6. Una formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en el tratamiento o prevención de mastitis en una vaca periparturienta.