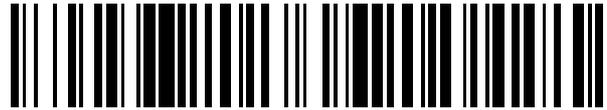


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 732**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2012 E 12728509 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2720710**

54 Título: **Formulaciones liofilizadas de FGF-18**

30 Prioridad:

17.06.2011 EP 11170437
21.06.2011 US 201161499216 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.06.2016

73 Titular/es:

ARES TRADING S.A. (100.0%)
Zone Industrielle de l'Ouriettaz
1170 Aubonne, CH

72 Inventor/es:

CERRETI, ALESSANDRA y
DEL RIO, ALESSANDRA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 575 732 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).

DESCRIPCION

Formulaciones liofilizadas de FGF-18

Campo de la invención

5 La invención se refiere al campo de las formulaciones farmacéuticas. Más particularmente se dirige a las formulaciones liofilizadas de la proteína del factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF-18) y a los métodos de producción de tales formulaciones. Las formulaciones liofilizadas de acuerdo con la invención son estables durante el almacenamiento a temperatura ambiente durante un período de tiempo apropiado.

Antecedentes de la invención

10 El factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF-18) es un miembro de la familia de proteínas del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), estrechamente relacionado con FGF-8 y FGF-17. Los miembros de la familia FGF se caracterizan por los dominios de unión a la heparina. Se ha identificado este dominio de unión a heparina putativo para FGF-18. Se postula que la señalización mediada por receptores se inicia tras la unión del ligando de FGF formando un complejo con proteoglicanos de sulfato de heparina de la superficie celular.

15 Se ha demostrado que el FGF-18 es un agente de proliferación para los condrocitos y los osteoblastos (Ellsworth *et al.*, 2002, *Osteoarthritis and Cartilage*, 10: 308-320; Shimoaka *et al.*, 2002, *J. Bio. Chem.* 277 (9): 7493-7500). FGF-18 ha sido propuesto para el tratamiento de trastornos del cartílago tales como la osteoartritis y la lesión del cartílago ya sea solo (documento WO2008/023063) o en combinación con ácido hialurónico (documento WO2004/032849).

20 Las composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de FGF son conocidas en la técnica. Los documentos WO00/21548 y WO02/17956 describen composiciones farmacéuticas que comprenden un FGF recombinante en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de vehículos o diluyentes para soluciones inyectables adecuadas incluyen agua o soluciones salinas isotónicas.

El documento WO2008/121563 está relacionado con formulaciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de FGF-21 preparado en una forma inyectable de dosificación unitaria junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo adecuado puede ser, entre otros, un azúcar, un tampón y/o un agente tensioactivo.

25 El documento WO92/01442 describe una composición liofilizada que comprende un FGF, un agente de espesante farmacéuticamente aceptable y, o bien i) una sal de un metal alcalino de celulosa o ii) una combinación de éster de ácido graso de polioxietileno sorbitán con cisteína. Los componentes i) y ii) permitir estabilizar la composición de FGF.

30 El documento WO01/39788 describe composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de FGF-18 junto con una citotoxina, en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una solución salina tamponada con fosfato.

35 El documento WO2008/023063 da a conocer formulaciones que comprenden un compuesto de FGF-18 junto con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, excipientes, o similares. Como ejemplo, se describe una formulación para inyección que comprende FGF-18 en vehículos tales como solución salina, solución de dextrosa, albúmina de suero y solución de Ringer.

40 En la preparación de una composición farmacéutica que comprende una proteína bioactiva, dicha composición debe ser formulada de tal manera que la actividad de la proteína se mantenga durante un período de tiempo apropiado. Una pérdida de la actividad / estabilidad de la proteína puede dar como resultado inestabilidades químicas o físicas de la proteína en particular debidas principalmente a la desnaturalización, agregación o oxidación. Los productos resultantes pueden ser en consecuencia farmacéuticamente inaceptables. Aunque se sabe que el uso de excipiente(s) aumenta la estabilidad de una proteína determinada, los efectos estabilizadores de estos excipientes dependen en gran medida de la naturaleza de los excipientes y de la propia proteína bioactiva. Los documentos US2003/113316, WO2007/076354, WO2008/121563 y WO97/04801 describen métodos usuales para la estabilización de las proteínas,

45 Sigue habiendo necesidad de nuevas formulaciones que contengan FGF-18 como ingrediente activo, en donde dichas formulaciones sean estables durante un período de tiempo apropiado y adecuadas para su uso en inyecciones, preferiblemente para inyecciones intraarticulares. Dichas formulaciones pueden ser útiles para la administración en el tratamiento de un trastorno del cartílago en un paciente, tales como osteoartritis o lesión del cartílago.

50 Compendio de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar una nueva formulación que contenga una proteína de FGF-18. Más particularmente, dicha formulación es una formulación estable secada por congelación (o liofilizada) que contiene FGF-18. La invención también proporciona métodos para preparar la formulación liofilizada de acuerdo con

la presente invención. La formulación liofilizada que se describe en el presente documento puede ser útil, después de su reconstitución, para la administración en el tratamiento de trastornos del cartílago.

En un primer aspecto, la invención proporciona una formulación liofilizada estable que comprende o que consiste en FGF-18, un tampón, un tensioactivo poloxámero y un azúcar como agente estabilizador. El tampón es un tampón fosfato, el tensioactivo poloxámero es poloxámero 188, y el agente estabilizador es sacarosa. El tampón mantiene el pH comprendido entre 7,0 y 7,5 y más particularmente en o alrededor de 7,2. En una realización preferida adicional, la concentración del tensioactivo poloxámero es de o aproximadamente de 0,1 a 0,4 mg / vial. Preferiblemente, FGF-18 se selecciona entre el grupo que consiste en: 1) un polipéptido que comprende o que consiste en la forma madura de FGF-18 humana, correspondiente a la secuencia que comprende o que consiste desde el resto 28 (Glu) hasta el resto 207 (Ala) de la secuencia SEQ ID NO: 1, 2) un polipéptido que comprende o que consiste en una forma truncada de FGF-18 humana que comprende o que consiste desde el resto 28 (Glu) hasta el resto 196 (Lys) de la secuencia SEQ ID NO:1, y 3) un polipéptido que comprende o que consiste en la secuencia SEQ ID NO:2. Más preferiblemente, FGF-18 es trFGF-18, tal como se define en lo sucesivo.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para la preparación de una formulación liofilizada estable de FGF-18, que comprende las etapas de:

- 1) formar una mezcla de FGF-18, junto con un tampón, un tensioactivo y un agente estabilizador, y
- 2) someter la mezcla a liofilización (secado por congelación),

donde el tampón es un tampón fosfato, el agente estabilizador es sacarosa, y el agente tensioactivo es poloxámero 188. En una realización preferida, el tampón mantiene el pH de o aproximadamente de 6 a 8, y más particularmente en o aproximadamente en 7,2. Preferiblemente, FGF-18 se selecciona entre el grupo que consiste en: 1) un polipéptido que comprende o que consiste en la forma madura del FGF-18 humana, correspondiente a la secuencia que comprende o que consiste desde el resto 28 (Glu) hasta el resto 207 (Ala) de la secuencia SEQ ID NO: 1, 2) un polipéptido que comprende o que consiste en una forma truncada de FGF-18 humana que comprende o que consiste desde el resto 28 (Glu) hasta el resto 196 (Lys) de la secuencia SEQ ID NO:1, y 3) un polipéptido que comprende o que consiste en la secuencia SEQ ID NO:2. Más preferiblemente, FGF-18 es trFGF-18, tal como se define en lo sucesivo.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un artículo de fabricación para uso farmacéutico o veterinario, que comprende:

- 1) un primer recipiente que comprende una formulación liofilizada estable, donde dicha formulación liofilizada comprende FGF-18, un tampón, un tensioactivo y un agente estabilizador, y
- 2) un segundo recipiente que comprende un disolvente para la reconstitución,

donde el tampón es un tampón fosfato, el agente estabilizador es sacarosa, el tensioactivo es poloxámero 188, y el disolvente para la reconstitución es agua o una disolución salina (por ejemplo, 0,9% w/v de cloruro de sodio para inyección). Preferiblemente, FGF-18 se selecciona entre el grupo que consiste en: 1) un polipéptido que comprende o que consiste en la forma madura de la FGF-18 humana, correspondiente a la secuencia que comprende o que consiste desde el resto 28 (Glu) hasta el resto 207 (Ala) de la secuencia SEQ ID NO:1, 2) un polipéptido que comprende o que consiste en una forma truncada de FGF-18 humana que comprende o que consiste en desde el resto 28 (Glu) hasta el resto 196 (Lys) de la secuencia SEQ ID NO: 1, y 3) que comprende un polipéptido o que consiste en la secuencia SEQ ID NO:2. Más preferiblemente, FGF-18 es trFGF-18, tal como se define en lo sucesivo.

Definiciones

- El término "proteína de FGF-18" o "FGF-18", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que mantiene al menos una actividad biológica de la proteína FGF-18 humana. FGF-18 puede estar nativa, en su forma madura, o en una forma truncada de la misma. Las actividades biológicas de la proteína FGF-18 humana incluyen especialmente el aumento de la actividad osteoblástica (véase el documento W098/16644) o la formación de cartílago (véase el documento WO2008/023063).

La FGF-18 humana, nativa o de tipo silvestre, es una proteína expresada por los condrocitos del cartílago articular. La FGF-18 humana se denominó en principio zFGF-5 y se describe completamente en el documento W098/16644. La secuencia SEQ ID NO: 1 corresponde a la secuencia de aminoácidos de la FGF-18 humana nativa, con un péptido señal que consiste en restos de aminoácidos 1 (Met) a 27 (Ala). La forma madura de FGF-18 humana corresponde a la secuencia de aminoácidos desde el resto 28 (Glu) hasta el resto 207 (Ala) de la secuencia SEQ ID NO: (180 aminoácidos). La FGF-18 tiene especificidad por FGFR4 y las variantes de corte "IILc" de FGFR3 y FGFR2 (Ellsworth et al., 2002, Osteoarthritis and Cartilage, 10: 308-320). La forma madura de FGF-18 tiene una masa promedio de 21,04 kDa.

La FGF-18, en la presente invención, se puede producir por un método recombinante, tal como se muestra en la solicitud WO2006/063362.

Dependiendo de los sistemas de expresión y de las condiciones, FGF-18 en la presente invención se expresa en una célula huésped recombinante con una metionina inicial (resto Met) o con una secuencia señal para la secreción. Cuando se expresa en huésped procarionta, tal como en *E. coli*, FGF-18 contiene un resto Met adicional en el N-terminal de la secuencia. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de FGF-18 humana, cuando se expresa en *E. coli*, se inicia con un resto Met en el N-terminal (posición 1) seguida de los restos del 28 (Glu) hasta el resto 207 (Ala) de la secuencia SEQ ID NO: 1.

- El término "forma truncada" de FGF-18, tal como se utiliza en este documento, se refiere a una proteína que comprende o consiste desde el resto 28 (Glu) al 196 (Lys) de la secuencia SEQ ID NO:1. Preferiblemente, la forma truncada de la proteína FGF 18 es el polipéptido designado "trFGF-18" (170 aminoácidos), que comienza con un resto de Met (en N-terminal), seguido de los restos de aminoácidos del 28 (Glu) –al 196 (Lys) de la FGF-18 humana de tipo silvestre. La secuencia de aminoácidos de trFGF-18 se muestra en la secuencia SEQ ID NO:2 (restos de aminoácidos del 2 al 170 de la secuencia SEQ ID NO: 2 que corresponden a los restos de aminoácido del 28 al 196 de la SEQ ID NO:1). trFGF-18 es una forma truncada recombinante de la FGF-18 humana, producida en *E. coli* (véase el documento WO2006/063362). trFGF-18 ha demostrado que presenta actividades similares a las de la FGF-18 humana madura, por ejemplo, aumenta la proliferación de condrocitos y la deposición de cartilago que conduce a la reparación y a la reconstrucción de una variedad de tejidos cartilagosos (véase WO2008/023063). trFGF-18, tiene una masa promedio de 19,83 kDa.

- El término "estabilidad", como se usa en el presente documento, se refiere a la estabilidad física, química, y conformacional de la FGF-18 en las formulaciones de acuerdo con la presente invención (y que incluye el mantenimiento de la potencia biológica). La inestabilidad de una formulación de proteína puede estar causada por la degradación o agregación química de las moléculas de proteína para formar polímeros de orden superior, deglicosilación, modificación de la glicosilación, oxidación o cualquier otra modificación estructural que reduzca al menos una actividad biológica de una proteína FGF-18 de la presente invención.

- El término solución o formulación "estable", tal como se usa en el presente documento, es una solución o formulación en la que el grado de degradación, modificación, agregación, pérdida de actividad biológica y similares, de las proteínas que contiene se controla de manera aceptable y no aumenta de manera inaceptable en el tiempo. Preferiblemente, la formulación conserva por lo menos más de 80% de la actividad de la FGF-18 durante un período de al menos 12 meses a temperatura ambiente. La formulación estabilizada de la presente invención que comprende FGF-18, tiene preferiblemente una vida útil de al menos aproximadamente 12 meses, 18 meses, más preferiblemente al menos 20 meses, todavía más preferiblemente alrededor de 24 meses, cuando se almacena a temperatura ambiente. Los métodos para el seguimiento de la estabilidad de la formulación FGF-18 de la presente invención están disponibles en la técnica, e incluyen los métodos descritos en los ejemplos descritos en este documento.

- El término "tampón", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a soluciones de compuestos que se sabe que son seguros en formulaciones para uso farmacéutico o veterinario y que tienen el efecto de mantener o controlar el pH de la formulación dentro el intervalo de pH deseado para la formulación. Los tampónes aceptables para controlar el pH a un pH moderadamente ácido para un pH moderadamente básico incluyen, pero no se limitan a, fosfato, acetato, citrato, arginina, TRIS, y tampónes de histidina. "TRIS" se refiere a 2-amino-2-hidroximetil-1,3, propanodiol, y a cualquier sal farmacológicamente aceptable del mismo. Según la presente invención, los tampones preferidos son tampones fosfato.

- El término "tensioactivo", como se usa en este documento, se refiere a un compuesto soluble que se puede utilizar en particular para aumentar la solubilidad en agua de sustancias hidrófobas, aceitosas o aumentar sino la miscibilidad de dos sustancias con diferentes hidrofobicidades. Por esta razón, estos polímeros se utilizan comúnmente en aplicaciones industriales, cosméticos y productos farmacéuticos. También se utilizan como sistemas modelo para aplicaciones de administración de fármacos, en particular con el fin de modificar la absorción del fármaco o de su suministro a los tejidos diana. Los agentes tensioactivos conocidos incluyen polisorbatos (derivados de polioxietileno; Tween), así como poloxámeros (por ejemplo, copolímeros a base de óxido de etileno y óxido de propileno, también conocidos como Pluronic®). Según la invención, el tensioactivo preferido es un tensioactivo poloxámero y aún más preferiblemente es el poloxámero 188 (Pluronic® F68).

- El término "agente estabilizador", "estabilizador" o "agente de isotonicidad", como se usa en este documento, es un compuesto que se tolera fisiológicamente y que confiere una estabilidad/ tonicidad adecuada a una formulación. Evita en particular el flujo neto de agua a través de las membranas celulares que están en contacto con la formulación. Durante el proceso de secado por congelación (liofilización), el estabilizador es también eficaz como un crioprotector. Los compuestos tales como glicerina, se usan comúnmente para tales fines. Otros agentes estabilizadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos o proteínas (por ejemplo, glicina o albúmina), sales (por ejemplo cloruro de sodio), y azúcares (por ejemplo, dextrosa, manitol, sacarosa y lactosa). Según la presente invención, el agente estabilizador preferido es un azúcar, incluso más preferiblemente sacarosa.

- El término "vial" o "contenedor", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a un depósito adecuado para conservar la formulación FGF-18 en forma liofilizada. Del mismo modo, conservará el disolvente para la reconstitución. Ejemplos de un vial que se puede utilizar en la presente invención incluyen jeringas, ampollas, cartuchos, u otros depósito similares adecuados para el suministro de la formulación de la FGF-18 al paciente mediante inyección, preferiblemente mediante inyección intraarticular. Alternativamente, el vial de conservación de la formulación de la FGF-18 y el que conserva el disolvente para la reconstitución pueden ser presentados como 2 compartimentos de un de un sistema de doble cámara (jeringa o cartucho por ejemplo). Los viales adecuados para el envasado de productos para la administración intraarticular son bien conocidos y reconocidos en la técnica.

-El término "disolvente", como se usa en el presente documento, se refiere a un disolvente líquido, ya sea acuosa o no acuosa. La selección del disolvente depende mucho de la solubilidad del compuesto de fármaco en dicho disolvente y del modo de administración. Un disolvente acuoso puede consistir únicamente de agua, o puede consistir en agua más uno o más disolventes miscibles, y puede contener solutos disueltos tales como azúcares, tampones, sales u otros excipientes. Los disolventes no acuosos utilizados más comúnmente son los alcoholes orgánicos de cadena corta, tales como, metanol, etanol, propanol, las cetonas de cadena corta, tales como acetona, y los polialcoholes, tales como glicerol. Según la presente invención, el disolvente preferido es un disolvente acuoso tal como el agua o un disolvente de solución salina.

-El término "trastorno del cartílago", como se usa en el presente documento, abarca los trastornos resultado de daños debidos a una lesión traumática o condropatía. Los ejemplos de trastornos del cartílago que se pueden tratar por la administración de la formulación de FGF-18 que se describen en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, artritis, tales como la osteoartritis o la artritis reumatoide, y la lesión del cartílago.

- El término "osteoartritis" se utiliza para indicar la forma más común de artritis. Puede ser causada por la desintegración del cartílago. Los trozos del cartílago pueden desprenderse y causar dolor e inflamación en la articulación entre los huesos. Con el tiempo el cartílago puede desgastarse por completo, y los huesos rozan entre sí. La osteoartritis puede afectar a cualquier articulación, pero por lo general afecta a las manos y las articulaciones que soportan peso, como las caderas, las rodillas, los pies y la columna vertebral. En un ejemplo preferido, la artrosis puede ser osteoartritis de rodilla o artrosis de cadera. La persona experta conoce completamente las clasificaciones de la osteoartritis que se utilizan en la técnica, en particular, el sistema de evaluación OARSI (véase, por ejemplo Custers et al., 2007). La osteoartritis es uno de los trastornos del cartílago preferidos que se pueden tratar mediante la administración de las formulaciones de FGF-18 de acuerdo con la presente invención.

- El término "lesión del cartílago", como se usa en el presente documento es un trastorno del cartílago o una lesión del cartílago resultado principalmente de un trauma. Las lesiones del cartílago pueden ocurrir como resultado de una destrucción mecánica traumática, en particular relacionadas con un accidente o cirugía. También se considera dentro de esta definición una lesión relacionada con el deporte o con el desgaste de los tejidos de la articulación relacionado con el deporte.

35 Descripción detallada de la invención

El objeto principal de la presente invención es una formulación liofilizada estable que comprende o que consiste en una proteína FGF-18, un tampón, un tensioactivo poloxámico y un azúcar como agente estabilizador. El tampón es un tampón fosfato, el tensioactivo poloxámico es poloxámico 188, y el agente estabilizador es sacarosa. Preferiblemente, la proteína FGF-18 se selecciona entre el grupo que consiste en: 1) un polipéptido que comprende o que consiste en la forma madura de la FGF-18 humana, correspondiente a la secuencia que comprende o que consiste del resto 28 (Glu) hasta el resto 207 (Ala) de la secuencia SEQ ID NO: 1, 2) un polipéptido que comprende o que consiste en una forma truncada de la FGF-18 humana que comprende o que consiste del resto 28 (Glu) hasta el resto 196 (Lys) de la secuencia SEQ ID NO:1, y 3) un polipéptido que comprende o que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2. Más preferiblemente, FGF-18 es trFGF-18.

La concentración de FGF-18 en la presente invención es, preferiblemente de o aproximadamente de 20 a 300 µg /vial, preferiblemente de o aproximadamente de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o 300 µg /vial, incluso más preferiblemente de o aproximadamente de 20, 30, 60, 100, 200 o 300 µg /vial. Se puede añadir un excedente de 5% de FGF-18, con el fin de evitar las pérdidas de proteínas que podrían ocurrir durante la formulación. Por ejemplo, para una concentración de 18-FGF de 30 m µg cg/vial, el compuesto se puede añadir en una cantidad de 31,5 m µg cg /vial.

Preferiblemente, las formulaciones de la invención mantienen por lo menos el 80% de la actividad biológica de FGF-18 en el momento de la liofilización y/o del envasado durante un periodo de al menos 12 meses (antes del primer uso). La actividad de FGF-18 puede medirse como se describe en la siguiente sección de "Ejemplos".

Los tampones preferibles según la presente invención son los tampones fosfato, y mantienen el pH comprendido entre 7,0 y 7,5, y aún más preferiblemente a o aproximadamente a 7,2.

La concentración del tampón en la solución total es preferiblemente de o aproximadamente de 5 a 500 mM. En una realización preferida, la concentración del tampón es de o aproximadamente de 10 a 100 mM. Preferiblemente, la concentración del tampón es de aproximadamente de 10 mM.

El agente estabilizador en la presente invención es preferiblemente un azúcar. El azúcar preferido es la sacarosa. Preferiblemente, la concentración del agente estabilizador es de o aproximadamente de 0,5 a 250 mg/vial, más preferiblemente de o aproximadamente de 1 a 100 mg/vial, más particularmente de o aproximadamente de 15 a 60 mg/vial, incluso más preferiblemente aproximadamente de 30 mg/vial.

- 5 El tensioactivo de acuerdo con la presente invención es un tensioactivo poloxámero, y en particular es poloxámero 188 (es decir, Pluronic® F68). Preferiblemente, la concentración de tensioactivo es aproximadamente de 0,01 a 10 mg/vial, más preferiblemente aproximadamente de 0,05 a aproximadamente 5 mg/vial, más particularmente aproximadamente de 0,1 a aproximadamente 1 mg/vial, incluso más preferiblemente aproximadamente de 0,1, 0,2 o 0,4 mg/vial, y, en particular, de o aproximadamente de 0,2 mg/vial.
- 10 En una realización preferida, la formulación liofilizada estable de la presente invención comprende o consiste en FGF-18 de o aproximadamente de 20, 30, 60, 100, 200, 300 µg/vial, tampón fosfato 10mM a pH 7,2, 30 mg/vial de sacarosa y 0,2 mg/vial de poloxámero 188. Cuando se incluye un exceso del 5%, la formulación liofilizada de acuerdo con la presente invención comprende FGF-18 de o aproximadamente de 21, 31,5, 63, 105, 210 o 315 mcg/vial.
- 15 En una realización adicional, la presente invención está dirigida a un procedimiento que comprende la formulación liofilizada estable:
- 1) FGF-18: sacarosa en una relación de concentración de o aproximadamente de 1:95.000 a o aproximadamente a 1:6000, preferiblemente de o aproximadamente de 1:92000, 1:61000, 1: 31000, 1:18450, 1: 9200 o 1: 6100,
 - 20 2) FGF-18: poloxámero 188 en una relación de concentración de o aproximadamente de 1:25 a o aproximadamente a 06:10, preferiblemente de o aproximadamente de 1: 25, 5:83, 5:42, 1:5, 2:5 o 6:10.
 - 3) FGF-18: tampón fosfato a pH 7,2 en una relación molar de o aproximadamente de 1:10500 a o aproximadamente a 1: 700, preferiblemente de o aproximadamente de 1:10500, 1:7000, 1:3500, 1:2100, 1:1050 o 1:700,

25 en donde la proteína FGF-18 se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en: 1) un polipéptido que comprende o consiste en los restos de aminoácidos 28(Glu)-207(Ala) de la secuencia SEQ ID NO:1, 2) un polipéptido que comprende o que consiste del los restos de aminoácidos 28(Glu)-196(Lys) de la secuencia SEQ ID NO:1, o 3) un polipéptido que comprende o que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2. Más preferiblemente, la proteína FGF-18 comprende o consiste en los restos de aminoácidos 28 (Glu)-207(Ala) de la secuencia SEQ ID NO: 1.

30

En aún otra realización, la presente invención se dirige a una formulación liofilizada estable que comprende:

- 1) FGF-18: sacarosa en una relación molar de o aproximadamente de 1:90000 o aproximadamente de 1:5000, preferiblemente de o aproximadamente de 1:87000, 1:58000, 1:29000, 1:17400, 1:8700 o 1:5800,
- 35 2) FGF-18: poloxámero 188 en una relación molar de o aproximadamente de 5:120 a o aproximadamente a 5:8, preferiblemente de o aproximadamente de 5: 1 18, 5:79, 10:79, 10:47, 5:12 o 5:8,
- 3) FGF-18: tampón fosfato a pH 7,2 en una relación molar de o aproximadamente de 1:10000 a o aproximadamente a 1: 700, preferiblemente de o aproximadamente de 1: 10000, 1: 6600, 1: 3300, 1: 2000, 1: 1000 o 1:700,

40 en donde la proteína FGF-18 se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en: 1) un polipéptido que comprende o consiste en los restos de aminoácidos 28(Glu)-207(Ala) de la secuencia SEQ ID NO:1, 2) un polipéptido que comprende o que consiste en los restos de aminoácidos 28(Glu)-196(Lys) de la secuencia SEQ ID NO:1, o 3) un polipéptido que comprende o que consiste en la secuencia SEQ ID NO:2. Más preferiblemente, la proteína FGF-18 comprende o consiste en los restos de aminoácidos 28(Glu)-196(Lys) de la secuencia SEQ ID NO:1. Aún más particularmente, la proteína FGF-18 comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO:2. En una realización particular, la proteína FGF-18 es trFGF-18

45

La invención proporciona además un método para la preparación de cualquiera de las formulaciones liofilizadas estables de FGF-18 descritas anteriormente, en donde el método comprende las etapas de:

- 1) formar una mezcla de FGF-18 junto con un tampón, un poloxámero 188 y sacarosa como agente estabilizador, y
- 50 2) someter la mezcla a liofilización.

Las etapas 1 y 2 se llevan a cabo utilizando procedimientos convencionales. A modo de ejemplo, con el fin de preparar una formulación estable adecuado, una cantidad dada de FGF-18, tal como trFGF-18, se mezcla con un tampón fosfato que mantenga el pH a o aproximadamente a 7,2, un poloxámero 188 y sacarosa. Cada uno de estos

compuestos (por ejemplo, FGF-18, el tampón, el agente tensioactivo y el agente estabilizador) se pueden utilizar de acuerdo con las concentraciones, pH y/o proporciones anteriormente descritas. La mezcla resultante se liofiliza y después se envasa en viales. Las variaciones que se puedan realizar en este proceso son conocidas por el experto en la técnica.

5 La invención también proporciona un artículo de fabricación, para uso farmacéutico o veterinario, que comprende:

- 1) un primer recipiente que comprende cualquiera de las formulaciones liofilizadas estables descritas anteriormente, dicha formulación comprende o que consiste en FGF-18, un tampón, un tensioactivo poloxámero, un azúcar como un agente estabilizador, tal y como se describen anteriormente, y
- 2) un segundo recipiente que comprende un disolvente para la reconstitución.

10 A modo de ejemplo, el primer recipiente comprende una formulación liofilizada estable que comprende o que consiste en una cantidad dada de FGF-18, como trFGF-18, un tampón fosfato que mantiene el pH en o aproximadamente en 7,2, poloxámero 188 y sacarosa, y el segundo recipiente comprende una disolución salina (0,9% w/v de cloruro de sodio por inyección). Cada uno de estos compuestos (es decir, FGF-18, el tampón, el agente tensioactivo y el agente estabilizador) se pueden utilizar de acuerdo con las concentraciones, el pH y/o las proporciones anteriormente descritas. Preferiblemente, el recipiente que contiene la formulación de FGF-18 y el que contiene el disolvente para la reconstitución corresponden a los dos compartimentos de un sistema de doble cámara (jeringa o cartucho, por ejemplo)

También se describe, un material de envasado que proporciona las instrucciones para reconstituir la formulación liofilizada de FGF-18 (primer recipiente) en el disolvente (segundo recipiente).

20 Las formulaciones liofilizadas de la invención pueden ser mantenidas desde por lo menos aproximadamente 12 meses hasta aproximadamente 24 meses. En las condiciones de almacenamiento preferidas, antes del primer uso, las formulaciones se mantuvieron lejos de la luz brillante (preferiblemente en la oscuridad), a temperatura ambiente (a o aproximadamente a 25° C).

25 La formulación liofilizada estable de la invención necesita ser reconstituida, preferiblemente bajo condiciones de esterilidad, con un disolvente, tal como el agua o una disolución salina (por ejemplo, 0.9% w/v de cloruro de sodio para inyección) antes de su uso, es decir, antes de la inyección. Después de la reconstitución, el volumen a inyectar es preferiblemente de 0,5 ml a 5 ml, más preferentemente 0,5, 1 o 2 ml. La formulación de FGF-18 se debe administrar preferiblemente dentro de una hora desde la reconstitución.

30 La presente invención proporciona formulaciones estables liofilizadas de FGF-18, en particular para un solo uso, adecuadas para uso farmacéutico o veterinario.

La formulación liofilizada estable que comprende FGF-18, en la presente invención, se puede utilizar, después de la reconstitución, para la administración para mejorar la reparación del cartílago o para el tratamiento de trastornos del cartílago, tales como osteoartritis o lesiones del cartílago.

35 Estas formulaciones liofilizadas estables, después de la reconstitución, son adecuadas para uso en inyección y en sistemas de suministro alternativos. En una realización particularmente preferida, las formulaciones de la invención se usan para la inyección intraarticular. Se pueden administrar, después de la reconstitución, por medio de inyección directa en el líquido sinovial de la articulación o directamente en la lesión. En una realización preferida de la presente invención, la administración intraarticular se realiza en una articulación seleccionada entre las articulaciones de la cadera, la rodilla, el codo, la muñeca, el tobillo, la columna vertebral, los pies, los dedos, los dedos del pie, la mano, el hombro, las costillas, los hombros, los muslos, las espinillas, los talones y los puntos óseos de la columna vertebral. En aún otra realización preferida, la administración intraarticular se realiza en la articulación de la cadera o de la rodilla.

45 Las formulaciones de FGF-18 de la presente invención tienen una estabilidad mejorada, y puede ser fácilmente almacenadas a temperatura ambiente (a o aproximadamente a 25° C) o a 2-8° C (véase los ejemplos siguientes), preferiblemente a temperatura ambiente. De hecho, los inventores han encontrado que las formulaciones liofilizadas que comprenden FGF-18 (por ejemplo trFGF-18), 10 mM de tampón fosfato a pH 7,2, 30 mg/ vial de sacarosa y 0,2 mg/vial de poloxámero 188 son estables en el tiempo, en particular cuando se almacenan a temperatura ambiente. Estas formulaciones minimizan la pérdida de principio activo, es decir, FGF-18. También se ha encontrado que dichas formulaciones son más resistentes a la oxidación y a la formación de agregados de proteínas.

50 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente la preparación de las formulaciones y composiciones de la invención. El alcance de la invención no deberá interpretarse como que consiste meramente en los siguientes ejemplos.

Descripción de la figura:

Figura 1: Muestra el efecto del agente tensioactivo (poloxámero 188) en la recuperación de FGF-18 antes de proceso de liofilización. Se utilizaron formulaciones previas que contienen 10 mg/ml (+ 5% por exceso) de FGF-18 en un tampón fosfato pH 7,2, variando la concentración de agente tensioactivo (de 0 a 0,2%). El contenido de proteína se evaluó para cada una de las formulaciones previas antes de la filtración (BF) y después de la filtración (T = 0).

Descripción de las secuencias:

SEQ ID NO.1: Secuencia de aminoácidos de la FGF-18 humana nativa.

SEQ ID NO.2: Secuencia de aminoácidos de la FGF-18 truncada recombinante (trFGF-18).

10 Ejemplos**Material**

La FGF-18 recombinante truncada (trFGF-18) de los presentes ejemplos se ha preparado por expresión en *E. coli*, de acuerdo con la técnica descrita en la solicitud WO2006/063362. En los siguientes ejemplos se utilizan indistintamente trFGF-18 y FGF-18.

15 Otras sustancias utilizadas en los ejemplos son las siguientes:

- Sacarosa (1,07653, Merck; peso molecular: 342,30 g/mol)
- Monohidrato de dihidrógenofosfato de sodio (1,06345, Merck)
- Dihidrato de fosfato de hidrógeno disódico (1.06586, Merck)
- Poloxámero 188 (Lutrol F 68 DAC, USP/NF, Basf; peso molecular: 8400 g/mol)

20 - El agua para inyección,

- Disolución salina (0,9% w/v de cloruro de sodio para inyección) - Anticuerpo monoclonal anti-FGF-18 clon # F5A2, para el contenido de proteínas (proporcionado por RBM)
- Células BAF3-FGFR3c (Universidad de Washington)
- Medio de cultivo selectivo 1640 de Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Invitrogen).

25 - Sistema de ensayo de luminiscencia ATPlite en 1 etapa (Perkin Elmer)

- Heparina H3149 (Sigma)

Equipo

- Amicon Ultra-4 limite 10.000 (UFC 8012024, Amicon)
- Biacore 2000 (Biacore)

30 - Incubadora de CO₂ (Heraeus)

- Columna TSK2000SWxl, 7,8 x 300 mm, 5 μ (TosoHaas, código 08540)
- Columna de protección TSKG2000 (Hichrom, código 8543)
- Sistemas de HPLC (Waters)
- Luminómetro (Perkin Elmer)

35 - Filtros de membrana de 0,22 μm (tipo Durapore GWVP, Millipore)

- Software de Stabileo (véase 1.1; paquete de Microsoft® Excel Visual Basic)
- Software GraphPad (Prism)
- Soportes de acero inoxidable con capacidad de 22 ml y 220 ml (Sartorius)
- Columna Zorbax 300SB-C18 (150X4.6cm)

40 - Viales de vidrio DIN2R (3 ml) (Nuova OMPI)

- Tapones de goma revestidos (S2F452, D777-1, B2-40, West Pharmaceutical)
- Tapones de caucho (código 179, gris W1816, Pharma-Gummi)

Métodos

Diferentes ensayos en las formulaciones

5 Se utilizaron los métodos estándar para:

- SE-HPLC,
- RP-HPLC,
- Humedad residual,
- pH,

10 - Osmolalidad (Hora 0, solamente),

- SDS-PAGE / SS, y
- Mapeo de péptidos / UPLC (formas oxidadas).

Contenido de proteínas

15 La cuantificación de la proteína, es decir, trFGF-18, en las diferentes formulaciones se realizó mediante Biacore. Se ensayaron muestras (25µL) que contienen trFGF-18 (adecuadamente diluido en presencia de 10 mg/ml de BSA) haciendo fluir, en 5µL/min a 25° C, sobre la superficie del sensor, previamente recubierto con el clon F5A2 del anticuerpo monoclonal anti-FGF-18, seguido por 5µl de glicina 10 mM a pH 2,0 como tampón regeneración. Se utilizó el patrón de referencia (IRS FGF-18 No. 051230), que va desde 125 hasta 2.000 ng/ml, en cada sesión de análisis. Los resultados se recogen como Unidad de Resonancia (RU) y los niveles de FGF-18 de cada muestra se extrapolaron a partir de la curva estándar ajustada utilizando el algoritmo cuadrático con transformación logarítmica de los datos.

20

Bioensayo

25 La actividad biológica de FGF-18 se mide como actividad de proliferación por medio de un bioensayo in vitro utilizando la línea celular estable BaF3 transfectada con el receptor 3c de FGF (FGFR3c). Las células BaF3 que expresan FGFR3c proliferan bajo el estímulo de FGF-18.

Las células BaF3/FGFR3c se cultivan en medio selectivo basado en RPMI 1640 en presencia de r-hIL-3 como factor de crecimiento. Con el fin de probar específicamente el efecto proliferativo de FGF-18, las células tienen que ser privadas de IL-3. Por lo tanto, las células se cultivaron a 37° C, 5% de CO₂, en ausencia de r- hIL-3 durante 26 horas antes del ensayo.

30 El estándar y las muestras se diluyeron 5 veces de forma seriada en un medio de ensayo con un intervalo de concentraciones de 0,002 U/ml hasta 177,5 U/ml. Las células BAF3/FGFR3c privadas de IL-3 (20.000 células/pocillo) se incuban a 37° C, 5% de CO₂ con FGF-18 en presencia de 1 µg/ ml de heparina y 10% de Suero de Ternero Recién Nacido, y después se evaluó la proliferación celular después de 48 horas de ensayo de luminiscencia "ATPlite 1 etapa", un sistema de control de ATP basado en luciferasa de luciérnaga.

35 La potencia de la muestra se mide aplicando el modelo de curva de dosis-respuesta extendido. Con este modelo, toda la curva dosis-respuesta del estándar y de las muestras se ajusta a la curva dosis-respuesta sigmoideal con un algoritmo de pendiente variable (4PL) que informa de los valores cps (es decir, cuentas por segundo) frente al logaritmo de los valores de las concentraciones de FGF-18. Se calcula automáticamente EC₅₀ para cada curva por el software GraphPad. La potencia de la muestra se calcula sobre la base de la relación entre la EC₅₀ de la preparación de referencia y la de la muestra desconocida (relación de potencia). La potencia de FGF-18 se expresa como U/ml.

40

Ejemplo 1: Formulaciones liofilizadas de trFGF-18

La composición de las formulaciones liofilizadas de FGF-18 se proporciona en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Composición de las formulaciones liofilizadas de FGF-18 (*)

Formulación N.º	Nombre de la formulación	FGF-18 (µg/vial)	Tampón	Sacarosa (mg/vial)	Poloxámero 188 (mg/vial)
1	FD-20	20	Fosfato 10 mM pH 7.2	30	0.2
2	FD-30	30	Fosfato 10 mM pH 7.2	30	0.2
3	FD-60	60	Fosfato 10 mM pH 7.2	30	0.2
4	FD-100	100	Fosfato 10 mM pH 7.2	30	0.2
5	FD-200	200	Fosfato 10 mM pH 7.2	30	0.2
6	FD-300	300	Fosfato 10 mM pH 7.2	30	0.2

(*) después de reconstitución con 1 mL de WFI (agua para inyección).

5 Las formulaciones liofilizadas se prepararon de la siguiente forma: Se disolvieron sacarosa y Poloxamer 188 en el tampón fosfato. Después, se añadió la cantidad necesaria de sustancia fármaco (trFGF-18), se comprobó el pH y la disolución se llevó hasta el volumen final. Después, la solución se filtró a través de una membrana de 0,22 µm (Durapore®) bajo presión de nitrógeno, manteniendo un coeficiente de filtración de aproximadamente 20 cc/cm² o de aproximadamente 50 cc/cm².

La disolución final se envasó de forma manual, en condiciones estériles en viales de vidrio (0,5 ml/vial) y se liofilizó de acuerdo con el siguiente ciclo:

ETAPA	Temperatura (°C)	Duración
Carga	+4	15 min
Congelamiento	-25	2 horas
Congelamiento	-15	1 hora y 40 min
Congelamiento	-45	3 horas
Secado primario	-10	14 horas
Secado secundario	+35	22 horas

10 Las formulaciones liofilizadas están listas para ser reconstituidas, en cualquier momento, con un disolvente, tal como el agua para inyección o una solución salina.

Ejemplo 2: Estudios preliminares de estabilidad de las formulaciones FGF-18

15 Ejemplo 2.1: Se utilizaron condiciones de estabilidad aceleradas (a 2-8° C, 25° C y 40° C con el fin de identificar las formulaciones previas liofilizadas para su estudio posterior (datos no mostrados).

20 Se prepararon varias formulaciones preliminares liofilizadas, con el fin de identificar las mejores formulaciones candidatas. En el marco de este estudio preliminar, se han evaluado diversos tampones, incluyendo tampones fosfato y de histidina. También se probaron diversas concentraciones de sacarosa y poloxámero 188. Se ensayaron las formulaciones pre-candidatas para determinar la pureza (por SE-HPLC y RP-HPLC), el contenido de proteínas (por Biacore), la actividad biológica (bioensayo in vitro), la humedad residual, el pH y la osmolalidad. Los datos de estabilidad de apoyo también se generaron por medio de SDS-PAGE/SS (pureza) y por mapeo de péptidos/UPLC (formas oxidadas).

Ejemplo 2.2 (datos de estabilidad para las formulaciones preliminares; datos no mostrados): Los datos de estabilidad obtenidos para las formulaciones liofilizadas preliminares mediante SE-HPLC durante 3-4 semanas de almacenamiento indican que el tampón fosfato a pH 7,2 es preferible, ya que se observaron niveles de pureza más elevados (es decir, mayor % de monómero) en comparación con el tampón histidina a pH 6 (ver tabla 2). La cantidad de sacarosa (15 µg/vial vs 30 µg/vial) desempeña también un papel en la estabilización de la FGF-18 en relación con la agregación, donde se observaron globalmente recuperaciones mayores de monómero con 30 µg/vial de sacarosa (almacenamiento a 25° C y 5° C). Además, se observó una mayor recuperación de proteína después de la etapa de filtración (antes del proceso de liofilización) al incrementarse el tensioactivo (es decir, poloxámero 188), con mejores resultados en 0,2 mg/vial (figura 1).

En base a los resultados de esta fase pre-formulación, se prepararon seis formulaciones liofilizadas para investigaciones posteriores (formulaciones 1-6 de la Tabla 1; también se hace referencia a las mismas como formulaciones candidatas).

Ejemplo 3: Estudios de estabilidad de las formulaciones liofilizadas de FGF-18

Se recopilaron los datos de estabilidad de las formulaciones liofilizadas candidatas de la Tabla 1 de dos semanas a 24 meses.

Ejemplo 3.1 (pureza por SE-HPLC): Los resultados de la evaluación estadística realizada por Stabileo de los datos de estabilidad generados por SE-HPLC se resumen en la Tabla 3: no se detectó ninguna pérdida significativa en la pureza (contenido de monómero) de ninguna formulación candidata liofilizada tras el almacenamiento a las diferentes temperaturas (hasta 6 meses a 40° C y hasta 24 meses a 25° C).

Ejemplo 3.2 (pureza por SDS-PAGE/SS): Los resultados generados por SDS-PAGE confirmaron niveles de pureza globales superiores al 99% de las formulaciones liofilizadas tras el almacenamiento a todas las temperaturas ensayadas (al menos 6 meses a 40° C y hasta 18 meses a 25° C). Los resultados se proporcionan en la Tabla 4.

Ejemplo 3.3 (pureza por RP-HPLC): Los resultados de la evaluación estadística realizada por Stabileo de los datos de estabilidad generados por RP-HPLC se resumen en la Tabla 5: no se detectó ninguna pérdida significativa en la pureza (% pico principal) para ninguna formulación candidata liofilizada tras el almacenamiento a las diferentes temperaturas (hasta 6 meses a 40° C y hasta 18 meses a 25° C). Por lo tanto, la formulación de FGF-18 de acuerdo con la presente invención no da lugar a ninguna pérdida de pureza en comparación con el material de partida (puro) FGF-18. Se observa que cuando el material de partida (antes de la formulación) no era totalmente puro (las impurezas no se resolvieron completamente por RP-HPLC), el pico previo a la formulación no se encontraba en el 100%, sino por ejemplo en el 77,5% para FD-30 y en el 87,4 % para FD-300 y el pico a T=0 era, por ejemplo, en el 76,8% para FD-30 y en el 87,7% para FD-300.

Ejemplo 3.4: (ensayo del contenido de proteína): Los resultados de la concentración de proteína medida por Bioacore se resumen en las Tablas 6 y 7. No se detectó ninguna pérdida importante por la filtración a través de la membrana de 0,22 µm, es decir, se observó una recuperación de proteína casi completa (véase la columna "AF" de la Tabla 6). Tras la reconstitución del producto liofilizado con 1 ml de WFI (véase la columna "T0" de la Tabla 6), se obtuvo una recuperación más baja, que puede ser explicada por la adsorción de la proteína en el vial de vidrio (tras la reconstitución, la solución de proteína se expone posteriormente a una superficie más grande).

Desde el punto de vista de la estabilidad, no se detectó por Biacore pérdida en el contenido de proteína para ninguna de las concentraciones en todas las temperaturas ensayadas, como se muestra en la Tabla 7 (hasta 6 meses a 40° C y hasta 24 meses a 25° C).

Ejemplo 3.5 (actividad biológica): Los resultados de la actividad biológica (expresada en U/recipiente) para todas las candidatas liofilizadas tras el almacenamiento se proporciona en la Tabla 8. Por ejemplo, la actividad biológica observada para la mayor concentración (300 µg/vial de trFGF-18) durante el almacenamiento, tanto a 25 ° C y 40 ° C era estable en el tiempo. Más variabilidad se observó con la concentración más baja FD-20. Dado que no se detectó ningún cambio en la estabilidad del producto en ninguna de las otras pruebas, esta disminución observada con FD-20 tiene que ser confirmada después de 39, 52, 78 y 104 semanas de almacenamiento a 25° C.

Ejemplo 3.6 (formas oxidadas): El nivel de formas oxidadas detectado para todas las concentraciones durante el almacenamiento se resume en la Tabla 9: entre los restos de Met que podrían experimentar oxidación, los resultados indican que Met 1 es más susceptible a la oxidación, para todas las concentraciones y a cualquiera de las temperaturas evaluadas.

Ejemplo 3.7 (humedad residual): No se produjo aumento significativo de la humedad residual durante el almacenamiento para todas las concentraciones; se midieron los valores de humedad residuales por debajo o aproximadamente del 1% a nivel global durante todo el estudio de estabilidad (véase la Tabla 10) (hasta 6 meses a 40° C y hasta 24 meses a 25° C).

Ejemplo 3.8 (variación del pH): No se observó variación significativa del pH durante el almacenamiento a ninguna de las temperaturas ensayadas, para todas las concentraciones (véase Tabla 11) (hasta 6 meses a 40° C y hasta 24 meses a 25° C).

5 *Ejemplo 3.9 (variación osmolalidad):* No se observó variación significativa de la osmolalidad durante el almacenamiento a ninguna de las temperaturas ensayadas, para todas las concentraciones (véase Tabla 12) (hasta 6 meses a 40° C y un máximo de 24 meses a 25° C).

Tabla 2: Porcentaje (%) de monómeros de FGF-18 en preformulaciones liofilizadas (10 µg/vial de FGF-18 y 0,2 mg/vial de F68) después del almacenamiento, analizado por SE-HPLC

Composición	40 °C		25 °C		5 °C	
	3s	4s	3s	4s	3s	4s
Tampón histidina pH 6; 30 mg/vial de sacarosa	81.6	71.9	78.2	75.5	82.3	83
Tampón fosfato pH 7; 30 mg/vial de sacarosa	88.1	90	89.4	91.2	96.5	93.4

10 Tabla 3: Porcentaje (%) de monómeros de FGF-18 en las formulaciones candidatas liofilizadas después del almacenamiento, analizado por SE-HPLC

40 °C								
	T=0	4 s	8 s	13 s	26 s			
FD-300	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9			
FD-30	100.0	99.7	99.8	99.8	99.8			
25 °C								
	T=0	13 s	26 s	39 s	52 s	78 s	102 s	
FD-300	100.0	99.9	100.0	99.9	100.0	99.9	100.0	
FD-30	100.0	99.8	99.8	100.0	99.8	99.4	100.0	
2-8 °C								
	T=0	4 s	8 s	13 s	26 s	39 s	52 s	78 s
FD-30	100.0	100.0	100.0	98.8	99.8	99.7	99.5	99.7

Tabla 4: Pureza de las formulaciones candidatas liofilizadas de FGF-18 después del almacenamiento, analizada por SDS-Page (en %)

40 °C				
	2 M	6 M	7 M	9 M
FD-300	>99.5	>99.0	-	-
FD-30	-	-	> 97.5	99.0
25 °C				
	7 M	9 M	12 M	18 M
FD-300	>97.5	>99.5	>99.0	>99.5
FD-30	> 99.0	99.0	> 99.0	> 99.0
2-8 °C				
	7 M	9 M	12 M	18 M
FD-30	>97.5	99.0	> 99.0	> 99.0

15

Tabla 5: Pureza de las formulaciones candidatas liofilizadas de FGF-18 después del almacenamiento, analizada por RO-HPLC

		40 °C							
		T=0	4 s	8 s	13 s	26 s	52 s	78 s	
FD-300 ^(a)	% del pico principal	87.7	87.4	87.4	87.5	87.3			
	% comparado con T=0	100.0%	99.7%	99.7%	99.8%	99.5%			
FD-30 ^(b)	% del pico principal	76.8	76.4	76.5	77.7	78.8			
	% comparado con T=0	100.0%	99.5%	99.6%	101.2%	102.6%			
		25 °C							
		T=0	4 s	8 s	13 s	26 s	39 s	52 s	78 s
FD-300 ^(a)	% del pico principal	87.7	87.7	87.7	87.6	87.1	87.6	87.5	87.2
	% comparado con T=0	100.0%	100.0%	100.0%	99.9%	99.3%	99.9%	99.8%	99.4%
FD-30 ^(b)	% del pico principal	76.8	76.7	76.7	77.1	78.8	78.4	77.5	78.6
	% comparado con T=0	100.0%	99.9%	99.9%	100.4%	102.6%	102.1%	100.9%	102.3%

^(a) El pico antes de la formulación era del 87.4%

^(b) El pico antes de la formulación era del 77.5%

Tabla 6: Recuperación de FGF-18 después de filtración/envasado, analizada por Biacore

	FGF-18 conc. (µg/mL)			Recuperación (%)**	
	BF	AF	T0*	AF	General
FD-30	55.6	56.1	26.4	100.9	95.1

BF= antes de la filtración; AF= después de la filtración; T0= en el vial

5 *Después de reconstitución con 1 ml de WFI, el lote original estaba en 0,5ml

**% de recuperación; comparado con la cantidad de proteína FGF-18 en las formulaciones BF.

Tabla 7: Recuperación de FGF-18 después del almacenamiento, en base al ensayo por Biacore (en las formulaciones candidatas liofilizadas)

40°C								
		T=0	4s	8s	13s	26s		
FD-300	µg/mL	293.5	298.9	325.9	288.7	296.7		
	% comparado con T=0	101.2%	103.1%	112.4%	99.6%	102.3%		
FD-200	µg/mL	198.6	195.1	198.8	187.1	191.9		
	% comparado con T=0	100.0%	98.2%	100.1%	94.2%	96.6%		
FD-60	µg/mL	58.8	56.8	59	58.1	55.2		
	% comparado con T=0	100.0%	96.6%	100.3%	98.8%	93.9%		
FD-30	µg/mL	27.3	28.1	29.6	27.6	27.5		
	% comparado con T=0	100.0%	102.9%	108.4%	101.1%	100.7%		
FD-20	µg/mL	18.7	18.6	18.4	18.6	18.7		
	% comparado con T=0	100%	99%	98%	99%	100%		
25°C								
		T=0	13s	26s	39s	52s	78s	
FD-300	µg/mL	293.5	274.5	296.3	299.4	281.2	290.8	
	% comparado con T=0	100.0%	93.5%	101.0%	102.0%	95.8%	99.1%	
FD-200	µg/mL	198.6	193.2	189.7	181.7	192.5	-	
	% comparado con T=0	100.0%	97.3%	95.5%	91.5%	96.9%	-	
FD-60	µg/mL	58.8	58.1	57.3	54	56.9	-	
	% comparado con T=0	100.0%	98.8%	97.4%	91.8%	96.8%	-	
FD-30	µg/mL	27.3	28.1	27.7	26.7	27.7	-	
	% comparado con T=0	100.0%	102.9%	101.5%	97.8%	101.5%	-	
FD-20	µg/mL	18.7	18.5	18.5	19.8	18.4	18.5	
	% comparado con T=0	100.0%	98.9%	98.9%	105.9%	98.4%	98.9%	
2-8°C								
		T=0	4s	8s	13s	26s	39s	52s
FD-30	µg/mL	26.4	27.2	29.5	28.6	27.4	26	27.4
	% comparado con T=0	100.0%	103.0%	111.7%	108.3%	103.8%	98.5%	103.8%

Tabla 8: Actividad biológica de trFGF-18 en las formulaciones candidatas liofilizadas, después del almacenamiento, en bioensayos (U/recipiente)

		40°C					
		T=0	4s	8s	13s	26s	
FD-300	Actividad biológica	468680	544646	483078	499936	539552	
	%comparado conT=0	100.0%	116.2%	103.1%	106.7%	115.1%	
FD-200	Actividad biológica	290000	320000	360000	300000	260000	
	%comparado conT=0	100.0%	110.3%	124.1%	103.4%	89.7%	
FD-60	Actividad biológica	90000	100000	100000	100000	80000	
	%comparado conT=0	100%	111%	111%	111%	89%	
FD30	Actividad biológica	49000	44000	45000	46000	37000	
	%comparado conT=0	100.0%	90%	92%	94%	76%	
FD-20	Actividad biológica	33170	29334	34030	30604	26569	
	%comparado conT=0	100.0%	88.4%	102.6%	92.3%	80.1%	
		25°C					
		T=0	13s	26s	39s	52s	78s
FD-300	Actividad biológica	468680	472222	507038	520000	450000	580000
	%comparado conT=0	100.0%	100.8%	108.2%	110.9%	96.0%	123.8%
FD-200	Actividad biológica	290000	300000	260000	240000	390000	-
	%comparado conT=0	100.0%	103.4%	89.7%	82.8%	134.5%	-
FD-60	Actividad biológica	90000	110000	90000	110000	110000	-
	%comparado conT=0	100.0%	122.2%	100.0%	122.2%	122.2%	-
FD-30	Actividad biológica	49000	43000	36000	45000	48000	-
	%comparado conT=0	100.0%	87.8%	73.5%	91.8%	98.0%	-
FD-20	Actividad biológica	33170	29586	27487	32000	26000	27000
	%comparado conT=0	100.0%	89.2%	82.9%	96.5%	78.4%	81.4%

Tabla9: Formas oxidadas de FGF-18, en las formulaciones candidatas liofilizadas después del almacenamiento (en %)

	Met 1		Met 116		Met 149		Met 84		
	+25 °C	+40 °C	+25 °C	+40 °C	+25 °C	+40 °C	+25 °C	+40 °C	
FD-300	T=0	2.04	2.04	0.36	0.36	1.97	1.97	0.43	0.43
	4 s	-	1.60	-	0.21	-	0.99	-	0.19
	8 s	-	1.43	-	0.92	-	1.20	-	0.48
	13 s	1.28	1.35	0.16	0.18	0.83	0.93	0.64	0.65
	26 s	1.62	1.67	0.20	0.19	1.25	1.30	0.52	0.52
FD-20	T=0	1.64	1.64	0.17	0.17	1.25	1.25	0.20	0.20
	4 s	-	2.16	-	0.13	-	2.22	-	0.19
	8 s	-	1.95	-	0.21	-	2.86	-	0.86
	13 s	2.48	2.17	0.18	0.18	2.68	2.18	0.72	0.57
	26 s	2.29	2.78	0.28	0.19	1.97	2.73	0.48	0.65

Tabla10: Humedad residual en las formulaciones candidatas liofilizadas de FGF-18, después del almacenamiento (en %)

40°C							
	T=0	4s	8s	13s	26s		
FD-300	1	0.7	0.6	0.8	1.1		
FD-200	1.0	0.7	0.7	0.8	1.3		
FD-60	0.8	0.8	0.7	0.8	1.3		
FD-30	0.8	0.7	0.9	0.5	1.2		
FD-20	0.9	1.1	0.7	0.8	1.1		
25°C							
	T=0	13s	26s	39s	52s	78s	104s
FD-300	1	1	1	0.3	0.8	0.8	1
FD-200	1.0	0.7	1.0	0.8	0.7	-	-
FD-60	0.8	0.8	1.0	0.9	0.7	-	-
FD-30	0.8	0.7	0.7	1	0.9	0.9	1
FD-20	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	1.0	-

Tabla11: Valores de pH de las formulaciones candidatas liofilizadas de FGF-18, después del almacenamiento

40°C							
	T=0	4s	8s	13s	26s		
FD-300	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1		
FD-200	7.0	7.1	7.1	7.1	7.1		
FD-60	6.9	6.9	6.9	7.0	7.0		
FD-30	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1		
FD-20	7.1	7.2	7.2	7.2	7.2		
25°C							
	T=0	13s	26s	39s	52s	78s	104s
FD-300	7.1	7.1	7.1	7.0	7.1	7.1	7.1
FD-200	7.0	7.1	7.1	7.1	7.0	-	-
FD-60	6.9	7.0	6.9	6.9	6.9	-	-
FD-30	7.1	7.1	7.1	7.1	7	7.1	7.1
FD-20	7.1	7.2	7.2	7.2	7.1	7.1	-

5

Tabla12: Osmolalidad de las formulaciones candidatas liofilizadas de FGF-18, después del almacenamiento

40°C							
	T=0	4s	8s	13s	26s		
FD-300	404.7	403	393	404.3	397.7		
FD-200	342	337	335	342	345		
FD-60	343	343	335	341	342		
FD-30	399	403	398	400	388		
FD-20	343.7	337.3	336.7	345.3	341.7		
25°C							
	T=0	13s	26s	39s	52s	78s	104s
FD-300	404.7	405.7	395.7	396.7	401	393.3	403
FD-200	342	342	344	343	331	-	-
FD-60	343	342	343	344	332	-	-
FD-30	399	399	382	394	394	403	389
FD-20	343.7	352	342	340	350.3	342.7	-

Referencias

- 1 Ellsworth et al., 2002, Osteoarthritis and Cartilage, 10: 308-320
- 2 Shimoaka et al., 2002, JBC 277(9)7493-7500
- 3 WO2008023063
- 5 4 WO2004032849
- 5 WO00/21548
- 6 WO2008/121563
- 7 WO92/01442
- 8 WO01/39788
- 10 9 W098/16644
- 10 WO2006/063362
- 11 Custers et al., 2007, Osteoarthritis and Cartilage, 15:1241 -1248

Listado de secuencias

<110> ARES TRADING S.A.

<120> Formulaciones liofilizadas de FGF-18

<130> P11/085

5 <150> EP 11170437.5
<151> 2011-06-17

<150> US 61/499,216
<151> 2011-06-21

<160> 2

10 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 207

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <220>

<223> FGF-18 humano

<400> 1

Met Tyr Ser Ala Pro Ser Ala Cys Thr Cys Leu Cys Leu His Phe Leu
1 5 10 15

Leu Leu Cys Phe Gln Val Gln Val Leu Val Ala Glu Glu Asn Val Asp
20 25 30

Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser
35 40 45

Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys
50 55 60

His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly
65 70 75 80

Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln
85 90 95

Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe Tyr Leu Cys Met Asn Arg
100 105 110

Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly Thr Ser Lys Glu Cys Val
115 120 125

Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Met Ser Ala
130 135 140

ES 2 575 732 T3

Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr Lys Lys Gly Arg Pro Arg
145 150 155 160

Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln Asp Val His Phe Met Lys
165 170 175

Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln Lys Pro Phe Lys Tyr Thr
180 185 190

Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile Arg Pro Thr His Pro Ala
195 200 205

<210> 2

<211> 170

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> FGF-18 truncado recombinante (trFGF-18)

<400> 2

Met Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg
1 5 10 15

Ala Arg Asp Asp Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr
20 25 30

Ser Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser
35 40 45

Ala Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr
50 55 60

Asp Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe
65 70 75 80

Tyr Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly
85 90 95

Thr Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr
100 105 110

Thr Ala Leu Met Ser Ala Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr
115 120 125

Lys Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln
130 135 140

Asp Val His Phe Met Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln
145 150 155 160

10

Lys Pro Phe Lys Tyr Thr Thr Val Thr Lys
165 170

REIVINDICACIONES

1. Una formulación liofilizada estable que comprende FGF-18, un tampón fosfato que mantiene el pH comprendido entre 7,0 y 7,5, poloxámero 188 y sacarosa.
- 5 2. La formulación liofilizada estable de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el tampón fosfato mantiene el pH en o aproximadamente en 7,2.
3. La formulación liofilizada estable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la concentración del tampón es de o aproximadamente de 5 a 100 mM.
4. La formulación liofilizada estable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la concentración de poloxámero 188 es de o aproximadamente de 0,1 a 0,4 mg/vial.
- 10 5. La formulación liofilizada estable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la concentración de sacarosa es de o aproximadamente de 10 a 60 mg/vial.
6. La formulación liofilizada estable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que la concentración de FGF-18 es de o aproximadamente de 20 a 300 µg/vial.
- 15 7. La formulación liofilizada estable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la formulación comprende 20, 30, 60, 100, 200 o 300 µg /vial de FGF-18, tampón fosfato 10 mM de que mantiene el pH en o aproximadamente en o aproximadamente en 7,2, 30 mg/vial de sacarosa y 0,2 mg/vial de poloxámero 188.
8. La formulación estable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la formulación comprende además un exceso de 5% de FGF-18.
- 20 9. La formulación liofilizada estable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que FGF-18 se selecciona del grupo que consiste en:
 - a. un polipéptido que comprende o que consiste en los restos de aminoácidos 28-207 de la SEQ ID NO:1,
 - b. un polipéptido que comprende o que consiste en los restos de aminoácidos 28-196 de la SEQ ID NO:1, y
 - c. un polipéptido que comprende o que consiste en SEQ ID NO:2.
- 25 10. Un método para producir la formulación liofilizada estable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende las etapas de:
 - a. formar una mezcla de FGF-18 junto con el tampón fosfato, el poloxámero 188 y la sacarosa, y
 - b. someter la mezcla a liofilización.
- 30 11. Un artículo de fabricación que comprende un primer recipiente que comprende la formulación liofilizada estable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un segundo recipiente que comprende un disolvente para la reconstitución.
12. El artículo de fabricación según la reivindicación 11, en el que el recipiente que comprende la formulación liofilizada estable y el que comprende un disolvente para la reconstitución son los dos compartimentos de un sistema de doble cámara.

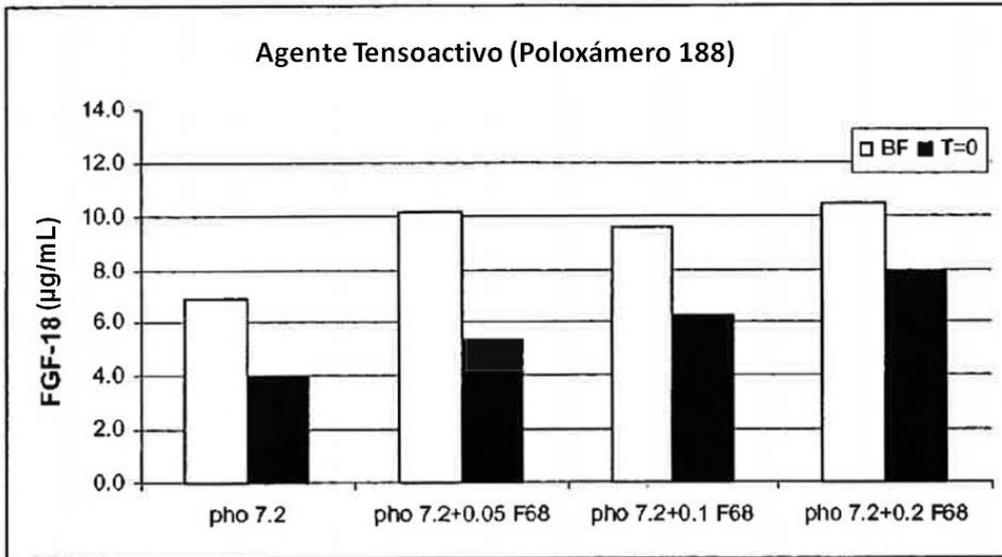


FIG. 1