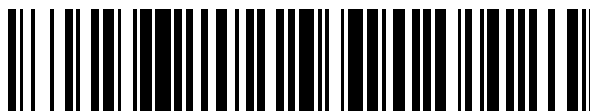


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 971**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 38/17</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 29/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 37/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/02</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/12</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/18</b>	(2007.01)
<b>A61K 47/26</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/19</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2014 PCT/EP2014/001029**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014 WO14173510**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2014 E 14722097 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2991667**

54 Título: **Formulaciones altamente concentradas de receptores Fc y solubles**

30 Prioridad:

**26.04.2013 EP 13002211**

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

**18.09.2017**

73 Titular/es:

**SUPREMOL GMBH (100.0%)  
Am Klopferspitz 19a  
82152 Martinsried, DE**

72 Inventor/es:

**SONDERMANN, PETER y  
POHL, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 632 971 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 altamente concentradas de receptores Fc $\gamma$  solubles

La presente invención se refiere a novedosas formulaciones de receptores Fc $\gamma$  solubles y especialmente a formulaciones que contienen altas concentraciones de un receptor Fc $\gamma$ R1IB soluble. La invención se refiere además al uso de formulaciones tales como composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, infecciones, tumores y otras afecciones en las que interviene el sistema inmunitario.

El Fc $\gamma$ R1IB soluble humano es una sustancia candidata prometedora para el tratamiento de la púrpura trombocitopénica idiopática, el lupus eritematoso sistémico y otras enfermedades autoinmunitarias. Es uno de una pluralidad de receptores de anticuerpos solubles que se han desarrollado durante los últimos 10 a 15 años.

El documento WO 00/32767 describe receptores Fc solubles (sFcR) que están compuestos únicamente de la parte extracelular del receptor y no están glicosilados. Debido a la ausencia del dominio transmembrana y del péptido señal, estas proteínas están presentes en una forma soluble y no se unen a las células como es normalmente el caso de los receptores Fc (FcR). Además, los sFcR descritos en el documento WO 00/32767 pueden producirse de forma recombinante y se han sugerido para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias debido a su capacidad para unirse a la parte Fc de anticuerpos sin interferir en otros componentes del sistema inmunitario. El documento WO 00/32767 describe adicionalmente la estructura cristalina de ciertos sFcR y la posibilidad de desarrollar sustancias que inhiban la interacción de IgG con sFcR con la ayuda de estas estructuras cristalinas. La aclaración de la estructura cristalina permite encontrar dichos inhibidores, por ejemplo, cribando las bases de datos mediante el uso de programas informáticos disponibles o mediante diseño de fármacos asistido por ordenador.

La invención que se definió en el documento WO 03/043648 desarrolló además los resultados del documento WO 00/32767 y proporciona procedimientos de tratamiento especialmente para enfermedades como la esclerosis múltiple (MS), el lupus eritematoso sistémico (LES) y la artritis reumatoide (RA) con un nivel elevado de células NK (citólicas naturales). Incluso si dichos receptores se produjeran de modo recombinante en procariotas y, por lo tanto, no se glicosilaron, los inventores del documento WO 03/043648 encontraron sorprendentemente que, aunque se esperaba que las proteínas no glicosiladas fueran poco solubles, los receptores podrían purificarse con concentraciones relativamente altas de hasta 50 mg/ml de sFc $\gamma$ R en una forma soluble.

Los documentos WO 00/32767, WO 03/043648 y otras publicaciones implican un papel importante de los FcR en reacciones de defensa del sistema inmunitario. Cuando los patógenos han entrado en la circulación sanguínea están unidos por inmunoglobulinas, también conocidas como anticuerpos. Dado que la respuesta inmunitaria a un patógeno es policlonal, una multitud de anticuerpos se producen y se unen a un patógeno, dando lugar a la formación de un inmunocomplejo (IC). Los IC son posteriormente fagocitados por células efectoras especializadas (por ejemplo, fagocitos o macrófagos) del sistema inmunitario y, por tanto, eliminados de la circulación. La fagocitosis está mediada por la unión de la parte Fc de los anticuerpos, los cuales, junto con el patógeno, forman los IC, a FcR en las células efectoras antes mencionadas. Otras células efectoras del sistema inmunitario, tales como células NK, eosinófilos y mastocitos también llevan FcR en su superficie, que al unirse a los IC liberan mediadores almacenados tales como factores de crecimiento o toxinas que soportan la respuesta inmunitaria.

Los FcR de estas células efectoras también funcionan como moléculas transductoras de señales que se unen específicamente a inmunoglobulinas de varios isotipos durante la respuesta inmunitaria humoral. Además, los FcR expresados en células NK desempeñan un papel fundamental en la destrucción de células diana revestidas con anticuerpos («citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos», ADCC).

Sin embargo, además de los efectos positivos de los FcR en la defensa contra patógenos, también pueden ocurrir reacciones excesivas provocadas por la presencia de autoanticuerpos en pacientes que dan lugar a una estimulación indeseada del sistema inmunitario que se manifiesta especialmente como enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias. Dichas reacciones inmunitarias dirigidas contra las propias sustancias del cuerpo siguen siendo un problema médico importante y, aunque hay métodos para tratarlas, estos métodos no son igualmente eficaces en cada paciente.

Todos los miembros de la familia de Fc $\gamma$ R, es decir, FcR que son específicos para anticuerpos del tipo IgG, son glicoproteínas integrales de membrana, que poseen dominios extracelulares relacionados con un conjunto C2 de dominios relacionados con inmunoglobulinas, que tienen un único dominio transmembrana y un dominio intracitoplásmico de longitud variable. Hay tres formas conocidas de receptores Fc $\gamma$ , denominadas Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ R1I (CD32) y Fc $\gamma$ R1II (CD16). La presente invención en modos de realización preferentes se centra específicamente en Fc $\gamma$ R1I (CD32).

Las proteínas Fc $\gamma$ R1I son glicoproteínas integrales de membrana de 40 kDa que solo se unen a la IgG complejada en los IC. Estos receptores son los Fc $\gamma$ R expresados más ampliamente, presentes en todas las células hemopoyéticas, incluyendo monocitos, macrófagos, linfocitos B, células NK, neutrófilos, mastocitos y plaquetas. Hay tres genes Fc $\gamma$ R1I humano (Fc $\gamma$ R1I-a, Fc $\gamma$ R1I-b, Fc $\gamma$ R1I-c), todos los cuales se unen a IgG en agregados o inmunocomplejos.

La inflamación es un proceso por el cual los leucocitos del organismo reaccionan a la infección por sustancias extrañas, tales como bacterias y virus. Generalmente se caracteriza por dolor, hinchazón, calor y enrojecimiento del tejido afectado. Las sustancias efectoras conocidas como citocinas y prostaglandinas controlan este proceso y se liberan en una cascada ordenada y espontánea en la sangre o en los tejidos afectados. La liberación de dichas sustancias efectoras aumenta el flujo de sangre al área de lesión o infección. Algunas de las sustancias efectoras causan una fuga de líquido en los tejidos, dando como resultado una hinchazón. Este proceso protector puede estimular los nervios y causar dolor. Estos cambios, cuando ocurren durante un período limitado en el área pertinente, actúan en beneficio del organismo.

En las enfermedades autoinmunitarias, el sistema inmunitario del paciente ha perdido la capacidad de distinguir entre las proteínas propias del cuerpo («las propias») y las extrañas. En consecuencia, se generan anticuerpos que reconocen autoproteínas y forman inmunocomplejos que activan continuamente el sistema inmunitario porque la autoproteína se produce permanentemente y se reconoce como extraña. Esta afección crónica puede persistir durante años, dando lugar en última instancia a daño orgánico grave y posiblemente a la muerte del paciente. Hay muchos trastornos autoinmunitarios diferentes que afectan al organismo de varias maneras. Por ejemplo, el cerebro se ve afectado en sujetos con esclerosis múltiple, el intestino se ve afectado en sujetos con enfermedad de Crohn, y la membrana sinovial, el hueso y el cartilago de varias articulaciones se ven afectados en sujetos que sufren de artritis reumatoide. A medida que los trastornos autoinmunitarios progresan, puede producirse la destrucción de uno o más tipos de tejidos corporales, el crecimiento anómalo de un órgano o cambios en la función orgánica. El trastorno autoinmunitario puede afectar a un solo órgano o tipo de tejido o puede afectar a múltiples órganos y tejidos. Los órganos y tejidos comúnmente afectados por trastornos autoinmunitarios incluyen eritrocitos, vasos sanguíneos, tejidos conjuntivos, glándulas endocrinas (por ejemplo, la glándula tiroidea o el páncreas), los músculos, las articulaciones y la piel.

Ejemplos de trastornos inflamatorios y/o autoinmunitarios incluyen, pero sin limitación, trombocitopenia inmunitaria primaria (ITP), lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR), anemia hemolítica autoinmunitaria (AHAI), diabetes, pénfigo vulgar, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad autoinmunitaria del oído interno, miastenia gravis, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, dermatomiositis, esclerosis múltiple, síndrome de Reiter, enfermedad de Graves, hepatitis autoinmunitaria, poliposis adenomatosa familiar y colitis ulcerosa.

Los Fc $\gamma$ R se pueden dividir en dos clases generales según su función, que puede ser activadora o inhibidora. Los receptores activadores están asociados con un motivo citoplásmico de activación basado en tirosina de inmunorreceptores (ITAM) de 16 aminoácidos que tiene la secuencia consenso Y-X2-L/IX<sub>6-12</sub>-YX2-I/L (Barrow y Trowsdale, *EuJI*, 2006, 36: 1646-1653). Este motivo se puede encontrar, por ejemplo, en Fc $\gamma$ RIIA. La otra clase de FcR son receptores inhibidores que contienen un motivo inhibidor de 6 aminoácidos (ITIM) en la parte citoplásmica del receptor que tiene la secuencia consenso S/I/V/LXYX2 - I/V/L (Barrow y Trowsdale, *EuJI*, 2006, 36: 1646-1653). Un ejemplo de dicho FcR inhibidor es Fc $\gamma$ RIIB.

Fc $\gamma$ RIIB (Fc $\gamma$ RIIB) tiene dos actividades inhibitoras. Una de ellas depende del motivo ITIM y ocurre cuando Fc $\gamma$ RIIB se liga a un receptor portador de un ITAM (por ejemplo, Fc $\gamma$ RIIA) que da lugar a la inhibición de la activación de calcio ITAM desencadenada por ITAM y la proliferación celular. La segunda acción inhibitora de Fc $\gamma$ RIIB implica homoagregación del receptor (agrupación de Fc $\gamma$ RIIB) que entrega una señal proapoptótica en el citoplasma. La señal proapoptótica solo se ha descrito en los linfocitos B y puede bloquearse mediante unión de Fc $\gamma$ RIIB al receptor de linfocitos B (BCR) (JV Ravetch, S. Bolland, *Annu Rev. Immunol.* 2001; 19:275-90).

Como se ha mencionado anteriormente, en el documento WO 03/043648, sFc $\gamma$ RIIB ya se ha descrito para su uso en preparaciones farmacéuticas en las que cantidades relativamente altas de receptores Fc $\gamma$  pueden incluirse en un volumen razonable de una solución de tratamiento para, por ejemplo, inyección en un paciente. Los receptores Fc $\gamma$  solubles y especialmente sFc $\gamma$ RIIB se han sugerido para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, ya que pueden unirse a los anticuerpos, pero no afectan a otros componentes del sistema inmunitario. Los receptores Fc solubles, por tanto, son capaces de neutralizar anticuerpos en el torrente sanguíneo, lo que tiene un efecto atenuante especialmente en procesos autoinmunitarios. Posibles indicaciones que ya se mencionan en el documento WO 03/043648 incluyen receptores Fc $\gamma$  solubles para el tratamiento de la esclerosis múltiple (EM), el lupus eritematoso sistémico (LES) y la artritis reumatoide (AR) y también para las enfermedades con un nivel elevado de células NK para evitar las desventajas de los procedimientos de tratamiento previamente utilizados para dichas enfermedades.

Las enseñanzas del documento WO 03/043648 se centran en el hecho descubierto de que los receptores Fc solubles se pueden utilizar para formar soluciones acuosas con una concentración de hasta 50 mg/ml de receptor soluble. Para ciertas aplicaciones dichas concentraciones de agente activo son suficientes. En estudios recientes, sin embargo, se ha establecido que una dosis terapéutica de sFcR como sFc $\gamma$ RIIB de significativamente más de 1 mg/kg de peso corporal del paciente es beneficiosa o incluso necesaria para un tratamiento exitoso de enfermedades autoinmunitarias.

La administración subcutánea de fármacos se considera un procedimiento eficaz y relativamente sin complicaciones

y no oneroso de administrar un agente activo a un paciente. En comparación con la infusión intravenosa, que requiere un equipo médico más extenso y en la mayoría de los casos la administración en un consultorio médico o una clínica, la administración subcutánea puede aplicarse fácilmente incluso por el propio paciente. La administración subcutánea también dará lugar a un inicio retardado de la acción, es decir, una mayor semivida y tiempo hasta la concentración máxima. Además, se encontró que la concentración plasmática máxima se reduce en caso de administración subcutánea. Estos efectos se basan en la administración debajo de la piel de un paciente desde donde el agente activo es transportado al torrente sanguíneo. En general, se considera que las proteínas mayores de aproximadamente 16-20 Da se absorben principalmente por el sistema linfático, lo que podría ser una ventaja para los Fc $\gamma$ R, ya que la población de linfocitos B diana madura y reside en el sistema linfático también (Porter, CJH y Charman, SA (2000), J. Pharm Sci. 89, 297-310).

Sin embargo, la vía de administración subcutánea está preferentemente limitada por un volumen de inyección de 1,0 ml hasta quizá 1,5 ml por aplicación (Gatlin, LA y Gatlin, CAB, (1999), Gupta, PK & Brazeau, GA, eds., Interpharm Press, Denver, páginas 401-425). Por lo tanto, las soluciones acuosas de sFc $\gamma$ R que se conocen del documento WO03/043648 no se podían haber considerado para administración subcutánea. Por el contrario, para concentraciones suficientemente altas de receptor, cabía esperar por las enseñanzas de este documento, precipitación y formación de cristales indeseablemente grandes de los receptores en la solución acuosa y, en consecuencia, obstrucción de las agujas y/o dolor en el lugar de inyección.

Por lo tanto, a pesar de todas las ventajas previstas, la administración subcutánea no parecía ser una vía de tratamiento prometedor, y más bien la inyección intravenosa o la infusión parecían ser el único procedimiento de administración viable.

En consecuencia, uno de los objetivos de la presente invención era proporcionar medios y condiciones para una administración menos complicada y onerosa de receptores Fc $\gamma$  a un paciente y para formulaciones acuosas de receptores Fc $\gamma$  solubles, especialmente de Fc $\gamma$ RIIB soluble, que contuvieran el receptor en una concentración suficientemente alta para permitir un régimen de tratamiento subcutáneo para enfermedades autoinmunitarias.

Otro objeto de la presente invención era proporcionar dichas formulaciones acuosas de receptor Fc $\gamma$  soluble altamente concentrado en una forma lista para usar que fuera estable en condiciones de conservación habituales para productos farmacéuticos durante más de 24 meses o, de forma alternativa, en una forma que permitiera una conservación a largo plazo y un ajuste y reconstitución sencillos y directos antes de su uso en aplicaciones subcutáneas.

Estos objetos se resolvieron de acuerdo con la presente invención mediante formulaciones que contenían un receptor Fc $\gamma$  soluble (sFc $\gamma$ R) en una solución acuosa tamponada en la que la concentración del receptor Fc $\gamma$  era superior a 60 mg/ml y contenía una sustancia tampón fisiológicamente aceptable.

Durante la investigación que dio lugar a la presente invención, se encontró sorprendentemente que, contrariamente a las expectativas anteriores, es posible proporcionar receptores Fc $\gamma$  solubles disueltos en soluciones tampón adecuadas con una concentración incluso mucho mayor que 70 mg/ml y preferentemente mayor que 150 mg/ml, por medio de la cual es posible por primera vez proporcionar sFc $\gamma$ R también en forma de una composición farmacéutica para la aplicación subcutánea. La aplicación subcutánea como modo parenteral de aplicación es más sencilla y más rápida que la aplicación intravenosa. Como se ha mencionado anteriormente, incluso el propio paciente puede llevar a cabo una aplicación subcutánea.

Se requiere una cánula corta y usualmente delgada para la administración subcutánea. La formulación altamente concentrada de la presente invención proporciona los sFc $\gamma$ R en una forma completamente disuelta y homogénea y con una viscosidad aceptable que permite el uso de estas cánulas delgadas o como cristales que contienen una suspensión de cristales que son lo suficientemente pequeños para pasar por estas cánulas delgadas. Por lo tanto, la comodidad de los pacientes se incrementa considerablemente y la administración de los receptores puede efectuarse por vía subcutánea.

Las formulaciones como las descritas a continuación permiten proporcionar Fc $\gamma$ R solubles y especialmente de Fc $\gamma$ RIIB soluble en concentraciones de hasta un valor máximo que está limitado principalmente por el aumento de la viscosidad de la solución debido a la alta concentración del receptor Fc. Tras la selección de sustancias tampón adecuadas y el ajuste de osmolalidades adecuadas, se permite una estabilización de 220 mg/ml de sFc $\gamma$ RIIB y más a un pH fisiológico dentro del marco de la presente invención.

Las sustancias tampón fisiológicamente aceptables, que se utilizan de acuerdo con la presente invención, son tampones de uso común para la aplicación farmacéutica de soluciones adecuadas. Sin embargo, en el marco de la presente invención se encontró que, dependiendo de la sustancia tampón utilizada, el valor del pH de la solución tiene una influencia considerable sobre la solubilidad de los receptores Fc. Dependiendo del tampón elegido, el valor del pH tiene que ajustarse dentro de un intervalo determinado y especialmente a un valor óptimo particular para conseguir la solubilidad deseada de los receptores Fc, especialmente si el propósito es proporcionar una formulación que no contenga ningún sFc $\gamma$ R cristalino.

Se encontró además que la propia proteína es capaz de actuar suficientemente como un tampón debido a la presencia de aminoácidos cargados positiva y negativamente. Así, por ejemplo, seleccionando un valor de pH apropiado basado en el valor de pK de las cadenas laterales de aminoácidos de las proteínas, es posible renunciar a la adición de una sustancia tampón separada siempre que esté presente una cantidad adecuada de proteína en la solución para actuar como sustancia tampón fisiológicamente aceptable.

En modos de realización preferentes de la presente invención, como sustancia tampón, la formulación contiene uno de un tampón histidina, un tampón citrato o un tampón fosfato. Sin embargo, se prefiere particularmente preparar la formulación con tampón histidina o citrato. En ambos casos, se encontró que el ajuste del valor del pH en estas soluciones tamponadas permite una adaptación de la solubilidad de los receptores Fc por medio de la cual pueden disolverse altas concentraciones de receptor Fc; sin embargo, también se puede hacer que cristalicen aumentando o disminuyendo el valor del pH dependiendo de la sustancia tampón utilizada. Esta posibilidad de cambiar entre formas solubles y cristalinas de sFcR por la mera adaptación del valor del pH implica considerables ventajas en vista de las adaptaciones con respecto a la aplicabilidad, conservación y estabilidad durante el almacenamiento de composiciones farmacéuticas.

Por ejemplo, durante los procedimientos de solicitud de autorización de comercialización, deben demostrarse suficientes estabildades durante el almacenamiento de los productos farmacéuticos. En este contexto, es esencial que los datos de estabilidad de un almacenamiento de al menos 12 meses a una temperatura de 5 °C sean incluidos por la parte que solicita la autorización de comercialización. Sin embargo, es deseable y ventajoso que se consiga una estabilidad durante el almacenamiento durante más de 24 meses en las condiciones correspondientes, por lo que, teniendo en cuenta las condiciones de almacenamiento mencionadas, una cantidad sustancial, preferentemente el 90 % del agente farmacéutico, necesita aún estar presente en una forma activa después de la fecha de caducidad.

En este contexto, las formulaciones presentan ventajas particulares. Por ejemplo, permiten ofrecer formulaciones de sFcR altamente concentradas en forma líquida que contienen exclusivamente receptor Fc disuelto y que muestran una alta estabilidad durante el almacenamiento.

Además, las formulaciones pueden someterse a liofilización para proporcionar una forma sólida de almacenamiento. Dichas formas sólidas podrían incluso mostrar una estabilidad durante el almacenamiento mejorada en comparación con las formulaciones líquidas. Dichas formulaciones son, por lo tanto, un tema adicional de la presente invención.

La liofilización puede realizarse de cualquier manera adecuada conocida por el experto para la liofilización de proteínas. Preferentemente, se utilizan condiciones lo más leves posibles para evitar la degradación de la proteína.

A partir de la forma sólida, las formulaciones líquidas listas para usar se pueden reconstituir fácilmente mediante la adición de agua para inyectables, solución salina o soluciones acuosas tamponadas para proporcionar el receptor Fc de nuevo en forma completamente disuelta o pueden elegirse etapas intermedias en las que la solubilidad se adapta según se desee.

También se describen formas concentradas de formulaciones.

Dichas formas concentradas se pueden obtener, por ejemplo, extrayendo parte del líquido por debajo del límite de solubilidad, lo que da lugar a formulaciones que contienen al menos algunos receptores cristalinos. También a partir de dichas formulaciones, el sFcR se puede reconstituir en una formulación líquida lista para usar añadiendo agua para inyectables, solución salina o soluciones acuosas tamponadas a la concentración deseada de sFcR activo y especialmente a concentraciones en las que el sFcR está presente completamente en forma disuelta.

Debido a la dependencia del pH que tiene la solubilidad del receptor Fc en las formulaciones de acuerdo con la presente invención, las formulaciones proporcionan la ventaja adicional de que se puede prácticamente hacer que el receptor Fc cristalice completamente mediante la adaptación del pH y puede obtenerse (por ejemplo, después de sedimentación o centrifugación) como suspensión de cristales concentrada. Los cristales obtenibles de este modo pueden ser muy pequeños (microcristales), especialmente dependiendo de las condiciones de cristalización. Cuanto más rápida sea la cristalización, más pequeños serán los cristales. Contrariamente a la técnica anterior, la presente invención permite la transformación rápida y casi cuantitativa de sFcR solubilizado en microcristales de proteínas y viceversa y permite, por lo tanto, adaptar las propiedades de solubilidad de las respectivas soluciones y formulaciones. Esta es una posibilidad adicional para garantizar una excelente estabilidad durante el almacenamiento y en particular la necesidad de solo un pequeño espacio de almacenamiento para un agente activo, que luego puede convertirse en una forma total o principalmente soluble por disolución en una solución acuosa tamponada adecuada que tenga un valor de pH adecuado. Esto puede hacerse, por ejemplo, inmediatamente antes de su aplicación como producto farmacéutico mezclando la suspensión de cristales concentrada con un tampón adecuado. De forma alternativa, una suspensión o formulación microcristalina podría administrarse directamente por aplicación subcutánea, ya que la presente invención proporciona medios para transformar el receptor en microcristales, es decir, cristales que son lo suficientemente pequeños para pasar por una cánula o aguja fina. En comparación con las formulaciones líquidas altamente concentradas, la viscosidad de dichas suspensiones de microcristales es mucho menor y no aumenta exponencialmente al incrementarse la concentración de proteína.

Para los propósitos de la presente invención y como se ha usado anteriormente en el contexto de la descripción de la presente invención, los receptores Fc $\gamma$  se consideran «cristalinos» cuando los cristales tienen un tamaño medio de más de 500  $\mu\text{m}$  de diámetro, mientras que las formas microcristalinas contienen microcristales con un tamaño de diámetro igual o inferior a 500  $\mu\text{m}$ .

5 La presente invención permite de una manera sin precedentes proporcionar receptores Fc solubles en altas concentraciones en diferentes formas adecuadas para uso farmacéutico inmediato o futuro. Como se ha ilustrado anteriormente, esto puede efectuarse en una forma disuelta lista para usar o en una forma sólida, por ejemplo, una forma liofilizada obtenida a partir de dicha solución o en forma microcristalina precipitada por adaptación del valor del pH, que se puede reconstituir después por resolubilización de manera que dé lugar a una formulación en la que el receptor Fc esté contenido en una alta concentración en una solución tampón adecuada al valor de pH deseado.

En la presente invención, la formulación contiene un receptor sFc $\gamma$ . En cuanto a la posibilidad de tratar enfermedades autoinmunitarias, tienen que considerarse los receptores sFc $\gamma$ RII y especialmente sFc $\gamma$ RIIB. Una formulación particularmente preferente contiene, por lo tanto, el receptor Fc $\gamma$ RIIB soluble en una solución farmacéutica aplicable con una sustancia tampón adecuada.

15 Para los propósitos de la presente invención, el receptor Fc $\gamma$ RIIB tiene una secuencia como la descrita en la técnica anterior, especialmente WO 00/32767 y WO 03/043648 u otros documentos que se refieren especialmente a Fc $\gamma$ RIIB y especialmente sFc $\gamma$ RIIB. Además, se pretende que el término abarque formas del receptor que pueden diferir especialmente en sus partes N-terminales. Una proteína sFc $\gamma$ RIIB especialmente preferente se muestra en la SEQ ID NO: 1. Esta secuencia contiene un residuo de metionina en el extremo N, que es, por ejemplo, necesario para la expresión procariótica; sin embargo, se elimina en una parte principal de las proteínas producidas por mecanismos bacterianos posteriormente. Por lo tanto, las proteínas de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 que carecen de la metionina N-terminal están también englobadas dentro de la presente invención, así como mezclas de proteínas con y sin la Met. N-terminal. Además, dependiendo del proceso de producción y del estado de la cepa de producción bacteriana, pueden producirse cambios adicionales en los cinco aminoácidos N-terminales. Por ejemplo, además de la metionina también pueden eliminarse los residuos siguientes o la metionina podría intercambiarse por otro aminoácido como la norleucina. Por lo tanto, también las mezclas de todas estas proteínas que difieren en el extremo N y que se originan a partir de procedimientos de producción usando una secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 están englobadas en la definición actual de sFc $\gamma$ RIIB y especialmente en el término husFc $\gamma$ RIIB.

20 En otros modos de realización preferentes, las proteínas Fc $\gamma$ RIIB se consideran englobadas en la presente invención siempre y cuando tengan una homología de al menos un 90 % con la proteína de SEQ ID NO: 1. Para la determinación de la identidad de secuencia se hace una comparación alineando las secuencias de manera que proporcione la máxima correspondencia de aminoácidos. Se prefiere especialmente que las diferencias en las proteínas reivindicadas se produzcan solo dentro de los diez primeros y más preferentemente dentro de los cinco primeros aminoácidos. Se prefiere especialmente que las proteínas tengan una identidad de aminoácidos de al menos un 95 %, ocurriendo las diferencias dentro de los cinco primeros aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en las que las diferencias en los aminoácidos se basan en al menos una de delecciones, sustituciones y adiciones.

25 La formulación de acuerdo con la presente invención contiene el receptor sFc $\gamma$  y especialmente el receptor sFc $\gamma$ RIII en concentraciones mayores de 60 mg/ml, más preferentemente mayores de 60-80 mg/ml, aún más preferentemente mayores de 80 mg/ml, incluso más preferentemente mayores de 100 mg/ml y particularmente preferente mayores de 150 mg/ml y lo más preferentemente aún mayores de 200 mg/ml.

30 Las formulaciones contienen además opcionalmente sustancias farmacéuticamente aceptables, que se utilizan por ejemplo para el ajuste de la fuerza iónica de la solución y/o para promover la solubilidad y estabilidad de la proteína receptora contenida en la misma. Dichas sustancias son conocidas por el experto. Para el ajuste de la fuerza iónica, la formulación contiene opcionalmente una sal y preferentemente NaCl. Para la estabilización de la proteína, se pueden usar polioles y especialmente azúcares y alditoles como sacarosa o manitol. Además, la formulación contiene preferentemente detergentes que son adecuados para aplicaciones farmacéuticas, como por ejemplo polisorbatos.

35 Las sustancias tampón están preferentemente contenidas en la formulación de la presente invención en una cantidad de 0,1  $\mu\text{M}$  a 300 mM. En modos de realización más preferentes, el tampón fisiológicamente aceptable está presente en una cantidad de 0,1 a 150 mM y especialmente de 1 a 50 mM.

40 Para el ajuste de la osmolalidad (isotonicidad), las sales como el cloruro de sodio son adecuadas en cantidades tales que ajustan una osmolalidad preferentemente fisiológica, al menos en la medida en que la formulación está destinada a la administración directa a un paciente. La osmolalidad de la solución se puede ajustar en un amplio intervalo y se puede fijar entre 10 mOsm/kg y más de 600 mOsm/kg sin tener un efecto considerable sobre la solubilidad del receptor Fc.

45 La sal, preferentemente NaCl, está presente en la formulación en una concentración de aproximadamente 0 a 250 mM, preferentemente de 5 a 200 mM y lo más preferentemente de 10 a 50 mM.

- 5 Los polioles como sacarosa no están necesariamente contenidos en las formulaciones de la invención; sin embargo, en modos de realización preferentes están presentes en una cantidad de al menos un 1,0 % y más preferentemente al menos un 2,0 %. El límite superior preferente de la cantidad de polioles es aproximadamente un 25 %, más preferentemente un 15 % y lo más preferentemente un 8 %. Se sabe que los azúcares estabilizan las proteínas en solución.
- Las sales y los azúcares necesitan equilibrarse para adaptar la osmolalidad de la formulación, preferentemente para ser isotónicos. Cuanto más azúcar esté contenido en la formulación, menos sal puede añadirse, y viceversa.
- Las cantidades adecuadas de detergentes, que se utilizan preferentemente dentro del contexto de la invención, son un 0,001-0,1 %, particularmente un 0,005-0,05 %.
- 10 Como ya se ha mencionado anteriormente, los resultados, que se han obtenido dentro del marco de la presente invención, permiten la adaptación de las condiciones de solubilidad para los receptores Fc solubles y especialmente sFc $\gamma$ RIIB de tal manera que, para un contenido de receptor Fc mayor de 50 mg/ml, se hace posible un suministro predeterminado de los receptores en forma completamente disuelta o en forma microcristalina para administración a un paciente. Como también se ha mencionado anteriormente, a menudo es ventajoso para una administración a un
- 15 paciente proporcionar una concentración tan alta como sea posible en una forma completamente disuelta o al menos transformable a una forma disuelta.
- Para formulaciones que contienen sFcR microcristalinos, también puede ser posible una administración al paciente, mediante la cual los microcristales se disuelvan completamente después de la administración y la sustancia activa está disponible con su efecto fisiológico. Para otras administraciones y también para almacenamiento, puede ser
- 20 ventajoso mantener más bien el receptor en forma cristalina, en la que es especialmente estable frente a la degradación y, por tanto, la pérdida de actividad.
- En consecuencia, modos de realización preferentes de la presente invención son formulaciones, que son completamente líquidas y en las que el receptor está presente en forma solubilizada o en forma microcristalina adecuada.
- 25 Una formulación especialmente preferente de la presente invención contiene el receptor Fc $\gamma$ RIIB soluble en una solución tamponada con citrato y posee un valor de pH igual o superior a 6. El valor del pH se ajusta preferentemente dentro de un intervalo de 6,0- ,5. En dichas soluciones tamponadas con citrato con un valor de pH fisiológico, el receptor Fc $\gamma$ RIIB es soluble en concentraciones mayores de 140 mg/ml. Debido al valor de pH fisiológico, dicha formulación también tiene la ventaja de que puede administrarse directamente a un paciente sin
- 30 causar efectos secundarios como dolor en el lugar de administración.
- En otro modo de realización preferente, el receptor Fc $\gamma$ RIIB soluble está contenido en una disolución tamponada con histidina con un valor de pH de 5,2-5,9. Cuando se utiliza un tampón histidina, sFc $\gamma$ RIIB es soluble en concentraciones de más de 100 mg/ml.
- 35 A un pH de aproximadamente 6,0, la solubilidad del receptor es todavía relativamente alta; sin embargo, comienzan a formarse precipitados cristalinos, mientras que a un pH más alto, solo se observa una solubilidad sustancialmente menor del receptor.
- Ambas formulaciones descritas anteriormente permiten una alta concentración de sFc $\gamma$ RIIB solubilizado, por lo que esto se podría demostrar tanto para la citada formulación tamponada con citrato como para la formulación
- 40 tamponada con histidina hasta el régimen limitado por la viscosidad de aproximadamente 220 mg/ml (véanse ejemplos adjuntos).
- Las formulaciones poseen además excelentes propiedades de estabilidad en ciclos de congelación/descongelación y también excelentes estabilidades a temperaturas reducidas de 2 °C-8 °C. Incluso la estabilidad a temperatura ambiente es excelente para estas soluciones.
- 45 La usabilidad de ambas soluciones se da tanto para una administración directa al paciente como para la producción de una formulación liofilizada o altamente concentrada que puede contener cristales y es cómoda para almacenar o generar soluciones inyectables que sean directamente reconstituibles por el paciente.
- Para la administración directa, como ya se ha mencionado anteriormente, la solución tamponada con citrato con un valor de pH fisiológico es particularmente preferente.
- 50 Un objeto adicional particularmente preferente de la invención es una formulación que contiene el receptor en forma cristalina. Dichas formulaciones se realizan preferentemente como una suspensión tamponada con citrato con un valor de pH de 5,2-5,9 o, de forma alternativa, como una suspensión tamponada con histidina a un valor de pH de 6,0-7,5. Dichas suspensiones pueden usarse preferentemente, por ejemplo, como formas estables durante el almacenamiento que, para la administración al paciente, pueden transformarse en una formulación que contiene altas concentraciones del receptor solubilizado por medio de ajuste del pH. Adicionalmente, también se pueden
- 55 concentrar o se puede obtener el receptor a partir de ellas por separación de la solución para obtener una

suspensión de cristales altamente concentrada. El receptor puede recuperarse en forma completamente disuelta mediante reconstitución en un tampón adecuado a un valor de pH adecuado.

Las formulaciones descritas y el hallazgo de que, utilizando ciertas sustancias tampón, dependiendo del valor de pH, pueden obtenerse diferentes niveles de solubilidad de los receptores Fc, permiten, por una parte, proporcionar inyecciones listas para usar para la administración subcutánea a un paciente o, por otra parte, proporcionar variantes particularmente estables durante el almacenamiento que contienen el receptor Fc cristalino. Incluso se proporcionan formas liofilizadas o de otro modo sólidas del receptor que pueden transformarse mediante una simple adición de las soluciones adecuadas en formas listas para usar que contienen altas concentraciones de receptor soluble.

Un objeto adicional de la presente invención es, por lo tanto, una composición farmacéutica, que comprende una formulación de acuerdo con la presente invención como se ha descrito anteriormente y en la que pueden estar presentes otros excipientes y/o adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. En modos de realización particularmente preferentes, estas composiciones farmacéuticas son directamente aplicables para la inyección subcutánea de una cantidad eficaz de un receptor Fc soluble y especialmente para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

En un modo de realización preferente, la composición farmacéutica contiene preferentemente una cantidad suficiente de receptor sFc completamente disuelto en una sustancia tampón adecuada y a un valor de pH fisiológico. Dicha composición farmacéutica es un medicamento listo para usar y puede aplicarse directamente al paciente. El receptor soluble disuelto puede, por ejemplo, absorberse fácilmente en la circulación linfática del paciente y ser directamente efectivo allí o después del transporte dentro del organismo del paciente por circulación de la sangre o un líquido corporal.

De forma alternativa, la composición farmacéutica puede contener el receptor en una forma altamente concentrada y al menos parcialmente microcristalina o cristalina. Diluida según sea necesario con soluciones tampón adecuadas, la composición farmacéutica es de nuevo particularmente adecuada para la inyección subcutánea de una cantidad eficaz de receptores Fc.

Como ya se ha explicado anteriormente en el contexto de la descripción de la presente invención, los receptores Fc se consideran «cristalinos» cuando los cristales tienen un tamaño medio de más de 500  $\mu\text{m}$  de diámetro, mientras que las formas microcristalinas contienen cristales con un tamaño igual o inferior a 500  $\mu\text{m}$  de diámetro. Por lo que respecta a la aplicación directa al paciente, se pueden utilizar, naturalmente, composiciones farmacéuticas que contienen un receptor Fc completamente disuelto, pero también tienen valor en aplicaciones farmacéuticas composiciones farmacéuticas que contienen formulaciones con el receptor Fc que están única o parcialmente en forma microcristalina. Estos microcristales son lo suficientemente pequeños para no obstruir las agujas para la aplicación subcutánea. El uso de soluciones que contienen microcristales puede ser beneficioso para, por ejemplo, la liberación retardada o sostenida del receptor sFc activo al sistema del paciente y, en ciertas circunstancias, dichas formas microcristalinas pueden considerarse incluso composiciones farmacéuticas preferentes.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención que contienen formas microcristalinas o cristalinas de receptores Fc pueden obtenerse, por ejemplo, mediante concentración del sFc más allá de su solubilidad por técnicas convencionales de concentración como ultrafiltración. Es posible mantener el producto farmacéutico en forma líquida que contenga cierta cantidad de cristales o microcristales. En lugar de usar un procedimiento de concentración mecánica para obtener cristales o microcristales, también es posible y un modo de realización preferente de la presente invención cristalizar el receptor ajustando el pH a un valor en el que el receptor tenga una solubilidad considerablemente menor. Los cristales o microcristales precipitados pueden separarse de la solución y utilizarse para el almacenamiento y posterior reconstitución o administración directa. Las formas sólidas de las formulaciones del receptor son especialmente estables durante el almacenamiento y mantienen su efectividad durante al menos más de 24 meses.

En dichos casos, la composición farmacéutica se proporciona convenientemente en un formato de kit farmacéutico que, además del sFcR sólido o altamente concentrado, comprende también el líquido adecuado para la reconstitución de una solución inyectable. Se describe un kit farmacéutico que contiene un receptor Fc soluble cristalino o liofilizado y una solución tampón similar a un líquido farmacéuticamente aceptable, o simplemente agua para la reconstitución de la solución inyectable en unidades de almacenamiento separadas adecuadas.

Se prefiere especialmente un kit farmacéutico, si el receptor de sFcR y la solución tampón para la reconstitución de la solución inyectable se proporcionan en dispositivos adecuados para una mezcla simple y bien protegidos contra la contaminación. Preferentemente, el kit contiene una solución tampón basada en un tampón fosfato, un tampón histidina o un tampón citrato. Se prefiere además para las soluciones tampón que el pH esté adaptado para proporcionar una solubilidad óptima para el receptor Fc. En modos de realización especialmente preferentes de la presente invención, la solución tampón es una solución tamponada con citrato con un pH de más de 6, especialmente de 6,1 a 7,5, o una solución tamponada con histidina con un pH de menos de 6,0, especialmente de 5,2 a 5,9. La solución tamponada con citrato es el tampón más preferente contenido en un kit farmacéutico de acuerdo con la presente invención.



La cantidad de solución tamponada contenida dentro del kit farmacéutico está adaptada a la cantidad de sFcR sólido o concentrado en el kit. Dependiendo de si se desea una disolución completa del receptor sFc o mantener cierta cantidad de microcristales, se selecciona un tampón correspondiente en una cantidad adecuada de líquido y también se adapta el pH de la solución de acuerdo con las enseñanzas referentes a la solubilidad de sFcR como se proporciona en el presente documento.

Otro objeto de la presente invención es el uso de las formulaciones y las composiciones farmacéuticas de la presente invención para la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. Más particularmente, la presente invención está destinada al uso en el marco de la prevención o tratamiento de esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, trombocitopenia inmunitaria primaria y anemia hemolítica autoinmunitaria (AHAI). Además, las formulaciones, agentes farmacéuticos y kits farmacéuticos se pueden usar para el tratamiento de trastornos inflamatorios. El objeto permite la aplicación de receptores Fc para todas las indicaciones para las cuales ya se han descrito o para las que se consideren adecuadas en el futuro. Las formulaciones y composiciones farmacéuticas y kits permiten especialmente la administración subcutánea que es muy eficiente y fácilmente aplicable a (o por) un paciente. La posibilidad de administrar cantidades y concentraciones especialmente altas de receptores Fc $\gamma$  solubles es una ventaja particular de la presente invención.

Los siguientes ejemplos explicarán además la invención y sus efectos y modos de realización ventajosos.

**Ejemplo: Desarrollo de formulaciones líquidas de alta concentración de husFc $\gamma$ RIIB adecuadas para administración subcutánea:**

**1. Materiales**

Las siguientes soluciones de husFc $\gamma$ RIIB (Fc $\gamma$ RIIB humano soluble que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO. 1) se utilizaron como material original para todos los experimentos:

a) 5 mg/ml de husFc $\gamma$ RIIB concentrado para solución para infusión

5 mg/ml de husFc RIIB en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5,3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,94 mM, NaCl 150 mM, manitol al 2 % (p/v), polisorbato 20 al 0,005 % pH 6,5

b) 20 mg/ml de husFc $\gamma$ RIIB concentrado para solución para infusión

20 mg/ml de husFc $\gamma$ RIIB en histidina 20 mM, de NaCl 150 mM, sacarosa al 2 % (p/v), manitol al 1 % (p/v), polisorbato 20 al 0,005 % pH 6,5.

Se usaron los siguientes productos químicos de al menos los grados indicados:

Nombre	Pureza:	Proveedor
Ácido cítrico monohidrato	p.a.	Merck
Hidróxido de sodio	Ph. Eur. ( $\geq 98$ %)	Carl Roth
Cloruro de sodio	Ph. Eur. ( $\geq 99$ %)	Carl Roth
Etanol, abs.	Ph. Eur. ( $\geq 99,8$ %)	Carl Roth
Histidina	Ph. Eur. ( $\geq 98,5$ %)	Carl Roth
Ácido clorhídrico al 37 %	p.a.	Carl Roth
Sacarosa	Ph. Eur. ( $\geq 99$ %)	Carl Roth
Manitol	Reactivo ACS ( $\geq 99$ %)	Fluka
Polisorbato 20 (Tween 20)	cultivo celular sometido a prueba	Sigma Aldrich
Trehalosa	para bioquímica	Merck

**2. Procedimientos**

**a) Contenido de husFc $\gamma$ RIIB por espectroscopia UV/Vis**

La muestra se transfirió a una microcubeta UV (microcubeta UV, Plastibrand, Brand) y la absorbancia se midió con un espectrofotómetro (Cary 100, Varian) usando el tampón respectivo como blanco. La concentración de husFc $\gamma$ RIIB se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{husFc}\gamma\text{RIIBconc. [mg/ml]} = (A_{280} - A_{320}) \times \text{FD} \times 0.64$$

FD ≡ factor de dilución

#### b) Intercambio de tampón husFc $\gamma$ RIIB por cromatografía de intercambio catiónico

1000-1800 mg de husFc $\gamma$ RIIB (5 mg/ml de concentrado de husFc $\gamma$ RIIB para solución para infusión) se diluyeron cuidadosamente con citrato/NaOH 10 mM pH 6,5 hasta que la conductividad alcanzó  $5,0 \pm 0,1$  mS/cm. La proteína diluida se filtró (0,2  $\mu$ m, filtro de membrana PVDF hidrófilo Durapore, 47 mm, Millipore) y se cargó a 5,5 ml/min en una resina de intercambio catiónico SP Sepharose HP (CEX) de 57 ml (26  $\times$  107 mm, GE Healthcare; equivale a 17,5-31,6 mg de husFc $\gamma$ RIIB/ml de resina) equilibrada en citrato/NaOH 10 mM, NaCl 20 mM pH 6,5. La proteína unida se lavó a 5,5 ml/min con 200 ml de citrato/NaOH 10 mM, NaCl 20 mM pH 6,5 y se eluyó con un gradiente lineal de 300 ml que variaba de 20 mM a 600 mM de NaCl en citrato/NaOH 10 mM pH 6,5. Se inició la recolección de eluido después de que la DO<sub>280</sub> excediera las 250 mUA (UA: unidades de absorbancia) y se detuvo después de caer por debajo de 200 mUA (1 cm de longitud de trayectoria, Åkta Explorer 100, GE Healthcare). La columna se regeneró con 100 ml de NaCl 1 M, se lavó con 150 ml de MilliQ H<sub>2</sub>O (agua ultrapura, Millipore Corp.) y se almacenó hasta su uso posterior en etanol al 20 %. Después de la medición del contenido de husFc $\gamma$ RIIB por espectroscopia UV/Vis, el material eluido se filtró (Millex 33 mm, filtro de 0,2  $\mu$ m Durapore PVDF (fluoruro de polivinilo) hidrófilo, ambos de Millipore Corp.), se obtuvieron alícuotas, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $\leq -70$  °C hasta su uso.

El contenido de NaCl se calculó por correlación de la media de la conductividad del eluido con la conductividad medida con citrato/NaOH 10 mM, NaCl 20 mM y citrato/NaOH 10 mM, NaCl 600 mM.

Se preparó HisFHc $\gamma$ RIIB tamponado con histidina de manera similar utilizando histidina/HCl 10 mM como especie tamponante.

#### c) Cribado de la estabilidad por el pH

Una solución concentrada de husFc $\gamma$ RIIB en histidina 20 mM, NaCl 324 mM pH 6,5 se ajustó a 0,5 mg/ml de husFc $\gamma$ RIIB, histidina 20 mM, NaCl 150 mM, 2,5X Sypro Orange (5000X en DMSO, Molecular Probes™, Invitrogen) utilizando soluciones madre adecuadas. El pH de la solución se ajustó entre pH 4 y pH 12 basado en una curva de titulación experimental con HCl 0,2 M o NaOH 0,2 M. Se incubaron 40  $\mu$ l de la solución en una placa sellada de 96 pocillos de media área ( $\mu$ clear, negro, medio de unión, Greiner BioOne) durante 3 h a 25 °C y se analizó la fluorescencia Sypro Orange (excitación 485 nm, emisión 590 nm, ganancia 60, tiempo de retardo 0  $\mu$ s, tiempo de integración 40  $\mu$ s, TECAN Spectrofluor plus).

#### d) Preparación de formulaciones de alta concentración

El contenido en NaCl requerido de husFc $\gamma$ RIIB tamponado con histidina o citrato (concentración inicial aproximadamente NaCl 200-300 mM) se ajustó por dilución con el tampón apropiado (citrato 10 mM o histidina 10 mM pH 6,5) y posterior ultrafiltración (Vivaspin 20,5 kDa MWCO, Sartorius). Para mantener pequeños los volúmenes procesados, se repitió el procedimiento hasta 3 ciclos en total. Después de la dilución final, se midió el pH (pehachímetro HI8314, pH-electrodo HI1217, instrumentos Hanna), se ajustó con NaOH 0,2 M o HCl 0,2 M en el tampón apropiado y se concentró la solución proteica. El contenido de husFc $\gamma$ RIIB se midió por medio de espectroscopia UV/Vis por triplicado, la concentración de husFc $\gamma$ RIIB se ajustó con el tampón apropiado y la solución se filtró (Ultrafree MC, 0,2  $\mu$ m Durapore PVDF hidrófilo, Millipore).

#### e) Cribados de solubilidad de husFc $\gamma$ RIIB en formato de 384 pocillos

La solubilidad de soluciones de husFc $\gamma$ RIIB de alta concentración en relación con las especies tamponantes, el pH, la concentración de sal y la concentración de azúcar/poliol se evaluaron en un formato de 384 pocillos ( $\mu$ clear, blanco, sin capacidad de unión, Greiner BioOne) usando 30  $\mu$ l por pocillo. Las formulaciones finales se prepararon por adición directa de soluciones madre filtradas a cada pocillo. Se usaron las siguientes soluciones madre: 100-195 mg/ml de husFc $\gamma$ RIIB, NaCl 1,5 M y sacarosa al 30 % (p/v) + manitol al 15 % (p/v) en citrato 10 mM pH 7,0 o histidina 10 mM pH 5,5. Cada solución se suministró con polisorbato 20 al 0,01 % (p/p) y, dependiendo del cribado, con NaCl 10-50 mM.

El pH de cada pocillo se ajustó con HCl 0,5 M-0,75 M o NaOH. La cantidad requerida de ácido o base se calculó a partir de la base de las curvas de titulación teóricas suponiendo que los nueve residuos histidina de husFc $\gamma$ RIIB ( $pK_a = 6,00$ ) proporcionan capacidad de tamponamiento adicional. La placa se centrifugó (500 g, 1 min), se selló con cinta adhesiva (cinta de microprueba, permacel, neo-lab) y se almacenó a  $5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$  en la oscuridad.

El aspecto visual de cada formulación se evaluó mediante microscopía óptica (Axiovert 25f, Carl Zeiss) y se clasificó según una escala arbitraria (0 = sin cristales, 1 = algunos cristales, apenas visibles, 2 = algunos cristales claramente visibles, 3 = más de 30 cristales por pozo claramente visibles, 4 = capa incompleta de muchos cristales (no totalmente cubiertos), 5 = capa completa de muchos cristales (bien cubiertos completamente)).

Teniendo en cuenta la sal disuelta, el azúcar y la proteína, se calculó la osmolalidad de cada formulación de acuerdo

con la siguiente ecuación:

$$\xi_m = \sum_i v_i m_i F_{m,i}$$

en la que  $v_i$  es el número de partículas formadas por la disociación de una molécula del  $i^{\text{ésimo}}$  soluto y  $m_i$  es la molaridad del  $i^{\text{ésimo}}$  soluto. Por simplicidad se aceptó que el coeficiente osmótico molar  $F_{m,i}$  para cada soluto era igual a 1.

#### f) Cristalización a pequeña escala de husFc $\gamma$ RIIB

Se diluyeron 10  $\mu$ l-450  $\mu$ l de husFc $\gamma$ RIIB a 50-140 mg/ml en histidina 10 mM, NaCl 10 mM, polisorbato 20 al 0,01 %, pH 5,5 con diluyentes apropiados a 40 mg/ml de husFc $\gamma$ RIIB en histidina 10 mM, NaCl 10 mM, polisorbato 20 al 0,01 % en un tubo de reacción de polipropileno de 1,5 ml. El pH se ajustó a 6,5-7,2 mediante la adición de un 4,38-6,23 % en volumen (volumen final después de la adición de diluyentes) de NaOH 0,3 M. La cantidad requerida de ácido o base se calculó a partir de la base de las curvas de titulación teóricas suponiendo que los nueve residuos histidina de husFc $\gamma$ RIIB (pKa = 6,00) proporcionan capacidad de tamponamiento adicional.

#### g) Fluorometría diferencial de barrido

se prepararon 120  $\mu$ l de cada formulación que contenía a 0,5 mg/ml de husFc $\gamma$ RIIB en un tubo de ensayo de 1,5 ml de manera similar al procedimiento descrito anteriormente en 2.e). Se añadió Sypro Orange (5000X en DMSO, Molecular Probes™, Invitrogen) a una concentración final de 2,5X usando una solución madre de 200X en el tampón apropiado. Se transfirieron por triplicado 30  $\mu$ l de cada formulación a una placa de pocillos (placa de reacción óptica MicroAmp de 96 pocillos, Applied Biosystems) y la placa se selló con cinta adhesiva (película adhesiva óptica MicroAmp, Applied Biosystems). La placa se sometió a una rampa de temperatura de 19 °C a 90 °C con una pendiente de 1 °C/min y se registró la emisión de fluorescencia a 610 nm (sistema de PCR en tiempo real 7300, Applied Biosystems). La fluorescencia se diferenció con respecto al tiempo, se calculó una interpolación (*spline*) y se informó del primer máximo detectado como la temperatura de fusión de husFc $\gamma$ RIIB (Origin 8.0, OriginLab).

#### h) Cribado de la turbidez en formato de 384 pocillos

Se prepararon formulaciones husFc $\gamma$ RIIB en un tubo de ensayo de 1,5 ml de forma similar al procedimiento descrito anteriormente en 2.3). Se transfirieron por duplicado 30  $\mu$ l de cada formulación a una placa de 384 pocillos (uclear, blanco, sin capacidad de fijación, Greiner), la placa se selló con cinta adhesiva (cinta de microprueba, permacel, neo-lab) y se colocó en una estufa de incubación. Como control se prepararon las respectivas soluciones placebo. La turbidez se midió a 360 nm (Spectrafluor, filtro de paso de banda 360/35 nm, 3 destellos, Tecan). Para evitar mediciones dañadas debido a la condensación de agua, el lector de placas se precalentó a la temperatura del ensayo.

#### I) viscosidad dinámica por medición de la caída de presión

La viscosidad dinámica de las formulaciones que contienen husFc $\gamma$ RIIB se determinaron midiendo la caída de presión cuando el líquido fluye a través de un canal de flujo (m-Vroc, Rheosense). Para cada medida se llenó una formulación que contenía 100  $\mu$ l con una pipeta de 200  $\mu$ l en el cilindro de una jeringa de gas de 100  $\mu$ l (Hamilton). La jeringa se instaló en el reómetro y se inyectaron 80  $\mu$ l con un caudal de 50  $\mu$ l/min y 20 °C.

#### j) Ensayo de determinación cuantitativa de Polysorbato 20

El contenido de polisorbato se determinó mediante un protocolo modificado que se basa en el ensayo colorimétrico descrito por primera vez por Brown y Hayes, (1955) *Analyst* **80**, 755-767. 500  $\mu$ l de la solución que se iba a analizar se extrajeron tres veces con 500  $\mu$ l de acetato de etilo en un tubo de polipropileno de 1,5 ml (VWR). Para acelerar la separación de fases, el tubo se centrifugó (20 000 g, 5 minutos, 25 °C). Los sobrenadantes orgánicos se combinaron en un vial de HPLC (ND9, roscado, con fondo cónico y tapa de rosca de PTFE, VWR) y el disolvente se evaporó (25 °C, 10 mbar, 0,5 h-1 h). Los sólidos residuales se suspendieron en 800  $\mu$ l de solución de reactivos (Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 100 mM, NH<sub>4</sub>SCN 2,63 M en agua) y se extrajeron con 150  $\mu$ l de CHCl<sub>3</sub>. Se transfirieron 100  $\mu$ l del extracto de CHCl<sub>3</sub> a una microcuva de UV de cuarzo (Hellma), se midió el espectro desde 200-800 nm (espectrofotómetro de matriz de diodos 8453, Agilent) y se registró la absorbancia a 620 nm corregida por la absorbancia a 530 nm. Como blanco se utilizó un extracto de una solución equivalente que no contenía polisorbato 20. Cada muestra se preparó por duplicado. El contenido de polisorbato 20 se determinó a partir de una curva estándar del 0 al 0,006 % (p/p) de polisorbato 20 en el tampón respectivo.

#### k) Liofilización

Se prepararon 59 formulaciones que contenían 15-120 mg/ml de husFc $\gamma$ RIIB en citrato 5 mM, NaCl 10-25 mM, sacarosa, trehalosa o manitol al 2-8 % (p/v), y polisorbato 20 al 0,005-0,01 % (p/v) y se llenaron 400  $\mu$ l en viales de

1,5 ml de HPLC transparente (32 × 11,6 mm, abertura ancha, WWR). Los viales se sometieron a un ciclo de liofilización conservador usando el liofilizador Epsilon 2-12D FD02 (Martin Christ, Osterrode, Alemania). El vacío durante el proceso de liofilización se controló mediante un manómetro de capacitancia de MKS. Las muestras se congelaron a -45 °C, se realizó el secado primario durante 15 h a 45 °C a 15 °C, 0,12 mbar y el secado secundario se realizó durante 10 h a 15 °C a 20 °C, 0,12 mbar. El liofilizado se reconstituyó en 100-400 µl de agua para inyectables. La solución se analizó con respecto a la formación de partículas por inspección visual, medición de turbidez y microscopía de fluorescencia. En resumen, para el examen microscópico de fluorescencia, 50 µl de la solución que contenía husFc $\gamma$ RIIB se colocó en una placa de 384 pocillos ( $\mu$ clear, blancos, sin capacidad de unión, Greiner) y se mezcló con 5 µl de Sypro Orange 25X (5000X en DMSO, Molecular Probes™, Invitrogen) en citrato 5 mM, NaCl 10 mM pH 6,7. La placa se incubó durante 10 min a 25 °C, se centrifugó (1'000 g, 3 min) y se evaluó el aspecto de cada formulación mediante microscopía de fluorescencia (Axiovert25f, filtro de excitación 470/20 nm, dicróico 493 nm, filtro de emisión 503-530 nm, Carl Zeiss).

### 3. Resultados

#### a) Definición del intervalo de pH y de las especies de amortiguamiento para soluciones de husFc $\gamma$ RIIB de alta concentración

El intervalo de pH desnaturalizante de husFc $\gamma$ RIIB se determinó usando Sypro Orange como indicador de la presencia de proteína desplegada. Sypro Orange es un colorante sensible al medio ambiente cuya emisión de fluorescencia aumenta fuertemente después de su unión a estructuras hidrófobas (Layton y Hellings, 2010, *Biochemistry* **49** (51), 10831-10841). La Fig. 1 muestra los resultados de experimentos para determinar el intervalo de pH desnaturalizante. Por lo tanto, 0,5 mg/ml de husFc $\gamma$ RIIB en histidina 20 mM, de NaCl 150 mM (o) y blanco de tampón (+) se incubaron a los respectivos pH durante 3 horas a temperatura ambiente. Un aumento en la fluorescencia Sypro Orange indicó la presencia de husFc $\gamma$ RIIB desnaturalizado. Como se muestra en la Fig. 1, husFc $\gamma$ RIIB no se desplegó desde pH 5,2 hasta al menos pH 11.

Para evitar el dolor durante la administración subcutánea, la solución administrada debe tener un pH en el intervalo fisiológico. Las especies tamponantes típicas que tamponan en este intervalo y, en general, se consideran seguras incluyen histidina (pKa ~ 6,0), citrato (pKa<sub>3</sub> -6,4) y fosfato (pKa<sub>2</sub> ~ 7,2). Debido a su tendencia a promover cambios de pH durante la congelación/descongelación (MacKenzie, 1977), el fosfato no se incluyó en los cribados de solubilidad posteriores.

En un primer intento de determinar la concentración limitante de husFc $\gamma$ RIIB con respecto a la precipitación de proteínas, husFc $\gamma$ RIIB se concentró por ultrafiltración en presencia de histidina 10 mM o citrato 10 mM y NaCl 10 mM hasta que se formó un precipitado visible. Como se muestra en la tabla 1, husFc $\gamma$ RIIB tamponado con histidina mostró una solubilidad incrementada en el intervalo ligeramente ácido de pH 5,5 a 6,0, mientras que el citrato como especie tamponante proporcionó solubilidad en el intervalo de pH casi neutro alrededor de pH 6,5. En resumen, la solubilidad de husFc $\gamma$ RIIB a varios pH depende en gran medida de las especies tamponantes utilizadas. Por microscopía se demostró que el precipitado está compuesto de agujas cristalinas.

**Tabla 1:** Límite de solubilidad de husFc $\gamma$ RIIB (en mg/ml) en histidina 10 mM o citrato 10 mM a baja fuerza iónica desde pH 5,5 a 7,5. husFc $\gamma$ RIIB se concentró por ultrafiltración hasta que la solución se volvió turbia. husFc $\gamma$ RIIB tamponado con histidina precipitó a pH 6,0, 6,5 y 7,0 mientras que husFc $\gamma$ RIIB tamponado con citrato precipitó a pH 5,5 y pH 6,0. El sedimento se identificó como cristales de proteínas husFc $\gamma$ RIIB.

	Ph			
	5,5	6,0	6,5	7,0
<b>Histidina</b>	>162	<174	<40	<10
<b>Citrato</b>	<40	<158	>154	>148

#### b) Cristalización de husFc $\gamma$ RIIB

husFc $\gamma$ RIIB tamponado con histidina permanece soluble por encima de 100 mg/ml a pH 5,5 y puede cristalizarse por neutralización a baja fuerza iónica; por el contrario, husFc $\gamma$ RIIB tamponado con citrato permanece soluble a pH neutro por encima de 100 mg/ml y puede cristalizarse por acidificación suave a baja fuerza iónica (tabla 1). En una prueba adicional, la cristalización de husFc $\gamma$ RIIB se investigó en dependencia de la presencia y la cantidad de azúcar y NaCl en el tampón. La cristalización de husFc $\gamma$ RIIB se realizó en histidina 10 mM pH 6,7 (Fig. 2a) o citrato 10 mM pH 5,5 (Fig. 2b) en función de la concentración de NaCl y azúcar (2:1 sacarosa: manitol). husFc $\gamma$ RIIB se concentró en histidina 10 mM, NaCl 10 mM pH 5,5 o citrato 10 mM, NaCl 10 mM pH 7,0, respectivamente, hasta 140 mg/ml mediante ultrafiltración y se diluyó hasta 40 mg/ml con soluciones madre apropiadas. En el caso de husFc $\gamma$ RIIB tamponado con histidina, se determinó el rendimiento de cristales midiendo la concentración de husFc $\gamma$ RIIB en el sobrenadante después de 3 d a 2 °C-8 °C. En el caso de husFc $\gamma$ RIIB tamponado con citrato, no se

detectó crecimiento de cristales hasta el día 10. Por lo tanto, el rendimiento de cristales se determinó después de 14 d a 2,8 °C. Cada solución contenía polisorbato 20 al 0,01 %.

La Fig. 2 muestra que husFc $\gamma$ RIIB cristaliza más fácilmente y el rendimiento de cristales es mucho mayor en presencia de histidina 10 mM, NaCl 10 mM pH 6,7 en comparación con citrato 10 mM, NaCl 10 mM pH 5,5. Una reducción adicional de la concentración de cloruro de sodio de 10 mM a 5 mM dio como resultado un aumento marginal en el rendimiento de cristales cuando se usó histidina como especie tamponante, pero mostró un fuerte efecto al usar tampón citrato. La reducción de la concentración de sal por debajo de 5 mM y/o la reducción del pH podría estimular aún más el proceso de cristalización en presencia de citrato. El aumento de las concentraciones de NaCl o la adición de polioles, por ejemplo, sacarosa o manitol, por encima del 5 %, inhibía el proceso de cristalización.

La Fig. 3 muestra un experimento en el que la cristalización de husFc $\gamma$ RIIB se realizó en histidina 10 mM, NaCl 10 mM de en función del pH. husFc $\gamma$ RIIB en histidina 10 mM, NaCl 10 mM pH 5,5 se concentró hasta 140 mg/ml mediante ultrafiltración y se diluyó hasta 40 mg/ml con soluciones madre apropiadas. El rendimiento de cristales se determinó midiendo la concentración de husFc $\gamma$ RIIB en el sobrenadante después de 3 d a 2,8 °C. Cada solución contenía polisorbato 20al 0,01 %.

Dentro de un intervalo de pH de al menos 0,5 unidades, se puede cristalizar más del 93 % de husFc $\gamma$ RIIB tamponado con histidina. Con una concentración total de husFc $\gamma$ RIIB de 40 mg/ml el límite de solubilidad de husFc $\gamma$ RIIB en histidina 10 mM, NaCl 10 mM pH 6,7 –7,2 es inferior a 2,8 mg/ml. A pH 6,9, la cristalización se completó en menos de una hora a 25 °C.

### c) Cribado de la solubilidad de husFc $\gamma$ RIIB

Con el fin de definir los denominados puntos dulces de solubilidad, es decir, las condiciones en las que husFc $\gamma$ RIIB sigue siendo soluble por encima de 100 mg/ml y no cristaliza, varias formulaciones de husFc $\gamma$ RIIB se prepararon en una placa de microtitulación de 384 pocillos y se incubaron durante al menos 4 semanas a 2 °C-8 °C. Los parámetros incluidos en el cribado fueron concentración de husFc $\gamma$ RIIB (70, 100, 120 y 150 mg/ml), especies tamponantes (histidina o citrato), pH (t,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5), concentración de NaCl (10-225 mM) y contenido de azúcar (0-7,5 %). Los cribados iniciales a 70 mg/ml (tabla 2 y Ttabla 5) y 100 mg/ml de husFc $\gamma$ RIIB (tabla 3 y tabla 6) se realizaron con dos niveles de azúcar (0 % o 3 %) y cuatro concentraciones diferentes de NaCl (10, 50, 225 mM).

Básicamente, estos cribados previos reprodujeron los resultados que ya se habían obtenido durante el cribado de concentraciones anteriormente mencionado (ejemplo 2a) y los cribados de la cristalización (ejemplo 2b). husFc $\gamma$ RIIB tamponado con histidina cristaliza por encima de pH 5,5, mientras que husFc $\gamma$ RIIB tamponado con citrato cristaliza a un pH de 5,5 a 6,0. El aumento de las concentraciones de NaCl o de azúcar redujo el proceso de cristalización en ambos casos.

En todos los cribados subsiguientes a 120 mg/ml y 150 mg/ml de husFc $\gamma$ RIIB, solo se incluyeron formulaciones isotónicas con sangre, es decir, con una osmolalidad calculada alrededor de 308 mOsmol/kg. Por esta razón, las altas concentraciones de azúcar se correspondieron con bajas concentraciones de NaCl y viceversa. Formulaciones basadas en histidina con 120 mg/ml de husFc $\gamma$ RIIB fueron capaces de impedir la cristalización de husFc $\gamma$ RIIB con pH neutro y alta fuerza iónica, pero con una excepción todas las formulaciones basadas en histidina a 150 mg/ml de husFc $\gamma$ RIIB mostraron fuerte crecimiento de cristales después de 4 semanas a 2 °C-8 °C (tabla 4). Por otra parte, las formulaciones basadas en citrato eran estables hasta 150 mg/ml de husFc $\gamma$ RIIB desde pH 6,5 a 7,5 y en todas las combinaciones de azúcar/sal analizadas (tabla 7).

Por lo tanto, husFc $\gamma$ RIIB tamponado con citrato representa la mejor base para el desarrollo de una formulación líquida de alta concentración adecuada para la aplicación subcutánea, es decir, con pH y tonicidad fisiológicos.

**Tabla 2: Cribado de solubilidad basado en histidina a 70 mg/ml de husFc $\gamma$ RIIB y 2 °C-8 °C. El aspecto visual de cada formulación se evaluó mediante microscopía óptica y se clasificó según una escala arbitraria (0 = sin cristales, 1 = algunos cristales, apenas visibles, 2 = algunos cristales claramente visibles, 3 = más de 30 cristales por pozo claramente visibles; 4 = capa de muchos cristales (no totalmente cubiertos), 5 = capa de muchos cristales (bien cubiertos completamente)).**

husFc $\gamma$ RIIB (mg/ml)	pH	Azúcar [%]	NaCl [mM]	Osmolalidad [mOsm/kg]	0 d	1 d	8 d	14 d	29 d	Suma
70	5,5	0	10	24	0	0	0	0	0	0
70	6,0	0	10	24	1	3	4	4	4	16
70	6,5	0	10	24	2	5	3	5	5	22

ES 2 632 971 T3

husFcγRIIB (mg/ml)	pH	Azúcar [%]	NaCl [mM]	Osmolalidad [mOsm/kg]	0 d	1 d	8 d	14 d	29 d	Suma
70	7,0	0	10	24	1	5	5	5	5	21
70	7,5	0	10	24	0	0	5	5	5	15
70	5,5	3	10	137	0	0	0	0	0	0
70	6,0	3	10	137	0	0	2	3	3	8
70	6,5	3	10	137	0	5	5	5	5	20
70	7,0	3	10	137	0	0	0	0	5	5
70	7,5	3	10	137	0	0	5	5	5	15
70	5,5	0	50	104	0	0	0	0	0	0
70	6,0	0	50	104	0	2	3	3	3	11
70	6,5	0	50	104	0	0	0	0	5	5
70	7,0	0	50	104	0	0	0	0	1	1
70	7,5	0	50	104	0	0	4	4	4	12
70	5,5	3	50	217	0	0	0	0	0	0
70	6,0	3	50	217	0	0	0	0	2	2
70	6,5	3	50	217	0	0	0	0	3	5
70	7,0	3	50	217	0	0	0	0	0	0
70	7,5	3	50	217	0	0	1	3	5	9
70	5,5	0	225	454	0	0	0	0	1	1
70	6,0	0	225	454	0	0	0	0	0	0
70	6,5	0	225	454	0	0	0	0	0	0
70	7,0	0	225	454	0	0	0	0	0	0
70	7,5	0	225	454	0	0	0	0	0	0
70	5,5	3	225	567	0	0	0	0	0	0
70	6,0	3	225	567	0	0	0	0	0	0
70	6,5	3	225	567	0	0	0	0	0	0
70	7,0	3	225	567	0	0	0	0	0	0
70	7,5	3	225	567	0	0	0	0	0	0

**Tabla 3: Cribado de solubilidad basado en histidina a 100 mg/ml de husFcγRIIB y 2 °C-8 °C. El aspecto visual de cada formulación se evaluó mediante microscopía óptica y se clasificó según una escala arbitraria (0 = sin cristales, 1 = algunos cristales, apenas visibles, 2 = algunos cristales claramente visibles, 3 = más de 30 cristales por pozo claramente visibles; 4 = capa de muchos cristales (no totalmente cubiertos), 5 = capa de muchos cristales (bien cubiertos completamente)).**

ES 2 632 971 T3

husFcyRIIB (mg/ml)	pH	Azúcar [%]	NaCl [mM]	Osmolalidad [mOsm/kg]	0 d	1 d	8 d	14 d	28 d	Suma
100	5,5	0	10	25	0	0	0	0	0	0
100	6,0	0	10	25	5	5	5	5	5	25
100	6,5	0	10	25	0	5	5	5	5	20
100	7,0	0	10	25	0	1	4	4	5	14
100	7,5	0	10	25	0	0	0	0	0	0
100	5,5	3	10	138	0	0	0	0	0	0
100	6,0	3	10	138	1	4	4	4	4	17
100	6,5	3	10	138	0	5	5	5	5	20
100	7,0	3	10	138	3	5	5	5	5	23
100	7,5	3	10	138	2	2	2	2	4	12
100	5,5	0	50	105	0	0	0	0	1	1
100	6,0	0	50	105	0	3	3	4	4	14
100	6,5	0	50	105	5	5	5	5	5	25
100	7,0	0	50	105	4	5	5	5	5	24
100	7,5	0	50	105	2	3	1	0	1	7
100	5,5	3	50	218	0	0	0	0	0	0
100	6,0	3	50	218	1	4	4	4	4	17
100	6,5	3	50	218	4	5	5	5	5	24
100	7,0	3	50	218	0	0	0	0	4	4
100	7,5	3	50	218	0	0	0	0	1	1
100	5,5	0	225	455	0	0	0	0	0	0
100	6,0	0	225	455	0	0	0	0	0	0
100	6,5	0	225	455	0	0	0	0	1	1
100	7,0	0	225	455	0	0	0	0	0	0
100	7,5	0	225	455	0	0	0	0	0	0
100	5,5	3	225	568	0	0	0	0	0	0
100	6,0	3	225	568	0	0	0	0	0	0
100	6,5	3	225	568	2	2	3	3	3	13
100	7,0	3	225	568	0	0	0	0	0	0
100	7,5	3	225	568	0	0	0	0	0	0

**Tabla 4: Cribado de solubilidad basado en histidina a 120 mg/ml de husFc $\gamma$ R1IB y 2 °C-8 °C. El aspecto visual de cada formulación se evaluó mediante microscopía óptica y se clasificó según una escala arbitraria (0 = sin cristales, 1 = algunos cristales, apenas visibles, 2 = algunos cristales claramente visibles, 3 = más de 30 cristales por pozo claramente visibles; 4 = capa de muchos cristales (no totalmente cubiertos), 5 = capa de muchos cristales (bien cubiertos completamente)).**

5

husFc $\gamma$ R1IB (mg/ml)	pH	Azúcar [%]	NaCl [mM]	Osmolalidad [mOsm/kg]	0 d	7 d	14 d	28 d	Suma
120	5,5	6	50	332	0	0	0	0	0
120	6,0	6	50	332	0	0	0	3	3
120	6,5	6	50	332	0	0	0	4	4
120	7,0	6	50	332	0	0	0	0	0
120	7,5	6	50	332	0	0	1	1	2
120	5,5	4,5	75	326	0	1	1	2	4
120	6,0	4,5	75	326	0	0	1	1	2
120	6,5	4,5	75	326	0	0	4	4	8
120	7,0	4,5	75	326	0	0	0	0	0
120	7,5	4,5	75	326	0	2	3	3	8
120	5,5	3	100	319	2	2	3	3	10
120	6,0	3	100	319	0	0	2	3	5
120	6,5	3	100	319	0	0	0	0	0
120	7,0	3	100	319	0	0	0	0	0
120	7,5	3	100	319	0	0	0	0	0
120	5,5	1,5	125	313	0	5	5	5	15
120	6,0	1,5	125	313	0	0	1	2	3
120	6,5	1,5	125	313	0	0	0	0	0
120	7,0	1,5	125	313	0	0	0	0	0
120	7,5	1,5	125	313	0	0	0	0	0
150	5,5	6	50	334	2	2	2	2	8
150	6,0	6	50	334	0	2	3	3	8
150	6,5	6	50	334	0	5	5	5	15
150	7,0	6	50	334	0	0	0	5	5
150	7,5	6	50	334	0	0	0	5	5
150	5,5	4,5	75	327	0	1	3	S	9



husFcγRIIB (mg/ml)	pH	Azúcar [%]	NaCl [mM]	Osmolalidad [mOsm/kg]	0 d	7 d	14 d	28 d	Suma	
150	6,0	4,5	75	327		1	3	4	4	12
150	6,5	4,5	75	327		5	5	5	5	20
150	7,0	4,5	75	327		5	5	5	5	20
150	7,5	4,5	75	327		4	5	5	S	19
150	5,5	3	100	321		0	5	5	5	15
150	6,0	3	100	321		5	5	5	5	20
150	6,5	3	100	321		4	5	5	5	19
150	7,0	3	100	321		3	5	5	5	18
150	7,5	3	100	321		0	0	0	0	0
150	5,5	1,5	125	314		2	5	5	5	17
150	6,0	1,5	125	314		3	5	5	5	18
150	6,5	1,5	125	314		3	5	5	5	18
150	7,0	1,5	125	314		3	5	5	S	18
150	7,5	1,5	125	314		3	3	3	3	18

**Tabla 5: Cribado de solubilidad basado en citrato a 70 mg/ml de husFcγRIIB y 2 °C-8 °C. El aspecto visual de cada formulación se evaluó mediante microscopía óptica y se clasificó según una escala arbitraria (0 = sin cristales, 1 = algunos cristales, apenas visibles, 2 = algunos cristales claramente visibles, 3 = más de 30 cristales por pozo claramente visibles; 4 = capa de muchos cristales (no totalmente cubiertos), 5 = capa de muchos cristales (bien cubiertos completamente)).**

5

husFcγRIIB (mg/ml)	pH	Azúcar [%]	NaCl [mM]	Osmolalidad [mOsm/kg]	0 d	1 d	8 d	17 d	30 d	Suma	
70	5,5	0	10	24		0	3	5	5	18	
70	6,0	0	10	24		0	1	2	3	9	
70	6,5	0	10	24		0	0	0	0	0	
70	7,0	0	10	24		0	0	0	0	0	
70	7,5	0	10	24		0	0	0	0	0	
70	5,5	3	10	137		0	0	3	4	5	12
70	6,0	3	10	137		0	0	0	1	1	2
70	6,5	3	10	137		0	0	0	0	0	0
70	7,0	3	10	137		0	0	0	0	0	0
70	7,5	3	10	137		0	0	0	0	0	0
70	5,5	0	50	104		0	2	4	5	5	16
70	6,0	0	50	104		0	1	1	1	2	3

ES 2 632 971 T3

70	6.S	0	50	104	0	0	0	0	0	0
70	7,0	0	50	104	0	0	0	0	0	0
70	7,5	0	50	104	0	0	0	0	0	0
70	5,5	3	50	217	0	1	2	3	4	10
70	6,0	3	50	217	0	0	0	0	0	0
70	6,5	3	50	217	0	0	0	0	0	0
70	7,0	3	50	217	0	0	0	0	0	0
70	7,5	3	50	217	0	0	0	0	0	0
70	55	0	225	454	0	2	3	4	4	13
70	6,0	0	225	454	0	0	0	0	0	0
70	6,5	0	225	454	0	0	0	0	0	0
70	7,0	0	225	454	0	0	0	0	0	0
70	7,5	0	225	454	0	0	0	0	0	0
70	5,5	3	225	567	0	0	0	1	1	2
70	6,0	3	225	567	0	0	0	0	0	0
70	6,5	3	225	567	0	0	0	0	0	0
70	7,0	3	225	567	0	0	0	0	0	0
70	7,5	3	225	567	0	0	0	0	0	0

**Tabla 6: Cribado de solubilidad basado en citrato a 100 mg/ml de husFcγRIIB y 2 °C-8 °C. El aspecto visual de cada formulación se evaluó mediante microscopía óptica y se clasificó según una escala arbitraria (0 = sin cristales, 1 = algunos cristales, apenas visibles, 2 = algunos cristales claramente visibles, 3 = más de 30 cristales por pozo claramente visibles; 4 = capa de muchos cristales (no totalmente cubiertos), 5 = capa de muchos cristales (bien cubiertos completamente)).**

5

husFcγRIIB (mg/ml)	pH	Azúcar [%]	NaCl [mM]	Osmolalidad [mOsm/kg]	0 d	4 d	7 d	15 d	28 d	Suma
100	5,5	0	10	25	1	5	5	5	5	21
100	6,0	0	10	25	1	4	5	5	5	20
100	6,5	0	10	25	0	1	1	1	2	5
100	7,0	0	10	25	0	0	0	0	0	0
100	7,5	0	10	25	0	0	0	0	0	0
100	5,5	3	10	138	0	3	4	4	5	16
100	6,0	3	10	138	0	1	3	4	5	13
100	6,5	3	10	138	0	0	0	0	0	0
100	7,0	3	10	138	0	0	0	0	0	0

husFcγRIIB (mg/ml)	pH	Azúcar [%]	NaCl [mM]	Osmolalidad [mOsm/kg]	0 d	4 d	7 d	15 d	28 d	Suma
100	7,5	3	10	138	0	0	0	0	0	0
100	5,5	0	50	105	0	5	5	5	5	20
100	6,0	0	50	105	0	3	4	5	5	17
100	6,5	0	50	105	0	0	1	1	1	3
100	7,0	0	50	105	0	0	0	0	0	0
100	7,5	0	50	105	0	0	0	0	0	0
100	5,5	3	50	218	0	0	3	4	5	12
100	6,0	3	50	218	0	0	0	0	3	3
100	6,5	3	50	218	0	0	0	0	0	0
100	7,0	3	50	218	0	0	0	0	0	0
100	7,5	3	50	218	0	0	0	0	0	0
100	5,5	0	225	455	0	3	4	4	4	15
100	6,0	0	225	455	0	1	1	2	3	7
100	6,5	0	225	455	0	0	0	0	0	0
100	7,0	0	225	455	0	0	0	0	0	0
100	7,5	0	225	455	0	0	0	0	0	0
100	5,5	3	225	568	0	0	1	3	4	8
100	6,0	3	225	568	0	0	0	0	0	0
100	6,5	3	225	568	0	0	0	0	0	0
100	7,0	3	225	568	0	0	0	0	0	0
100	7,5	3	225	568	0	0	0	0	0	0

**Tabla 7: Cribado de solubilidad basado en citrato a 120 mg/ml de husFcγRIIB y 2 °C-8 °C.** El aspecto visual de cada formulación se evaluó mediante microscopía óptica y se clasificó según una escala arbitraria (0 = sin cristales, 1 = algunos cristales, apenas visibles, 2 = algunos cristales claramente visibles, 3 = más de 30 cristales por pozo claramente visibles; 4 = capa de muchos cristales (no totalmente cubiertos), 5 = capa de muchos cristales (bien cubiertos completamente)).

5

husFcγRIIB (mg/ml)	pH	Azúcar [%]	NaCl [mM]	Osmolalidad [mOsm/kg]	0 d	7 d	14 d	28 d	Suma
120	6,0	7,5	25	339	0	1	2	3	6
120	6,5	7,5	25	339	0	0	0	0	0
120	7,0	7,5	25	339	0	0	0	0	0
120	7,5	7,5	25	339	0	0	0	0	0

ES 2 632 971 T3

husFcyRIIB (mg/ml)	pH	Azúcar [%]	NaCl [mM]	Osmolalidad [mOsm/kg]	0 d	7 d	14 d	28 d	Suma
120	6,0	6	50	332	0	2	3	4	9
120	6,5	6	50	332	0	0	0	0	0
120	7,0	6	50	332	0	0	0	0	0
120	7,5	6	50	332	0	0	0	0	0
120	6,0	4,5	75	326	0	0	0	0	0
120	6,5	4,5	75	326	0	0	0	0	0
120	7,0	4,5	75	326	0	0	0	0	0
120	7,5	4,5	75	326	0	0	0	0	0
120	6,0	3	100	319	0	2	3	3	8
120	6,5	3	100	319	0	0	0	0	0
120	7,0	3	100	319	0	0	0	0	0
120	7,5	3	100	319	0	0	0	0	0
120	6,0	1,5	125	313	0	1	2	2	5
120	6,5	1,5	125	313	0	0	0	0	0
120	7,0	1,5	125	313	0	0	0	0	0
120	7,5	1,5	125	313	0	0	0	0	0
150	6,0	7,5	25	340	0	2	3	4	9
150	6,5	7,5	25	340	0	0	0	0	0
150	7,0	7,5	25	340	0	0	0	0	0
150	7,5	7,5	25	340	0	0	0	0	0
150	6,0	6	50	334	0	1	2	4	7
150	6,5	6	50	334	0	0	0	0	0
150	7,0	6	50	334	0	0	0	0	0
150	7,5	6	50	334	0	0	0	0	0
150	6,0	4,5	75	327	0	0	2	3	5
150	6,5	4,5	75	327	0	0	0	0	0
150	7,0	4,5	75	327	0	0	0	0	0
150	7,5	4,5	75	327	0	0	0	0	0

husFc $\gamma$ RIIB (mg/ml)	pH	Azúcar [%]	NaCl [mM]	Osmolalidad [mOsm/kg]	0 d	7 d	14 d	28 d	Suma
150	6,0	3	100	321	0	0	0	0	0
150	6,5	3	100	321	0	0	0	1	1
150	7,0	3	100	321	0	0	0	0	0
150	7,5	3	100	321	0	0	0	0	0
150	6,0	1,5	125	314	0	1	2	2	5
150	6,5	1,5	125	314	0	0	0	0	0
150	7,0	1,5	125	314	0	0	0	0	0
150	7,5	1,5	125	314	0	0	0	0	0

#### d) Estabilidad térmica de formulaciones de husFc $\gamma$ RIIB de alta concentración

La formación de agregados y partículas de proteínas no nativas podría representar un obstáculo importante para el desarrollo de una formulación proteica de alta concentración (Shire *et al.*, 2010, Capítulo 15. High-concentration antibody formulations. En Formulation and Process Development Strategies for Manufacturing Biopharmaceuticals. Jameel, F. & Hershenson, S., eds., John Wiley, Hoboken, NJ). Por esa razón, los candidatos para formulación (consúltese el ejemplo 2c) se clasificaron con respecto a su capacidad de preservar la estructura nativa de husFc $\gamma$ RIIB en presencia de estrés térmico y, por lo tanto, prohíben la agregación no nativa.

En primer lugar, la temperatura de fusión  $T_m$  de las formulaciones de husFc $\gamma$ RIIB tamponado con citrato se midieron por fluorimetría diferencial de barrido. La Fig. 4 muestra los resultados respectivos que se obtuvieron utilizando 0,5 mg/ml de husFc $\gamma$ RIIB en citrato 10 mM, azúcar al 4,5 % (2:1 (p/p) de sacarosa:manitol), NaCl 75 mM al pH indicado (Fig. 4 (a) y (c)) o 0,5 mg/ml de husFc $\gamma$ RIIB en citrato 10 mM pH 7,0 suplementado con la cantidad indicada de azúcar (2:1 (p/p) de sacarosa:manitol) y sal (Fig. 4 (b) y (d)). Las formulaciones de husFc $\gamma$ RIIB se calentaron en una placa de microtitulación de 96 pocillos a 1 °C/min en presencia de Sypro Orange y se registró la emisión de fluorescencia a 610 nm. Se muestran las gráficas de fluorescencia frente a temperatura (a) y (b) y sus primeras derivadas (c) y (d). El primer máximo en los gráficos dF/dT se definió como temperatura de fusión de husFc $\gamma$ RIIB.

Dependiendo de la composición de la formulación respectiva, se midieron los valores de  $T_m$  de 50,8 °C a 55,5 °C. La mayor influencia sobre la temperatura de fusión tuvo el pH con un aumento de  $T_m$  de aprox. 3,5 °C cuando el pH se redujo de 7,5 a 6,5. La adición de azúcar al 7,5 % aumentó la  $T_m$  en aprox. 1 °C (Fig. 5, que muestra el cambio de la temperatura de fusión de husFc $\gamma$ RIIB en función del pH, azúcar y concentración de sal en citrato 10 mM. Se muestran la media y la desviación estándar de tres pocillos independientes). Aunque la concentración de NaCl se redujo en paralelo, la estabilidad térmica aumentada es claramente una función del aumento de la concentración de azúcar y no de la disminución del contenido de sal, como se muestra en experimentos anteriores (datos no mostrados) y de acuerdo con la teoría de exclusión preferencial (Timasheff, 1992, Capítulo 9. Stabilization of Protein Structure. En Stability of Protein Pharmaceuticals, Part B: *In vivo* pathways of degradation and strategies for protein stabilization., TJ & Manning, M.C., eds., Plenum Press, New York, páginas. 265-285). Esto también se ejemplifica elevando la concentración de azúcar de un 7,5 % a un 40 %, lo que da lugar a un aumento de  $T_m$  de 6,2 °C.

A continuación se determinó en qué medida la estabilización de la estructura secundaria y terciaria de husFc $\gamma$ RIIB, como se indica por una alta temperatura de fusión, inhibiría la formación de agregados proteicos insolubles. Por lo tanto, la turbidez de las formulaciones de husFc $\gamma$ RIIB tamponado con citrato se midieron después de la incubación a 37 °C, una temperatura muy por debajo de la  $T_m$  medida. Con este propósito, la estabilidad en condiciones aceleradas de formulaciones de husFc $\gamma$ RIIB tamponado con citrato se determinó a 37 °C. La densidad óptica a 360 nm se midió como una función de la concentración de husFc $\gamma$ RIIB y concentración de sacarosa después de 1 h (a), 12 h (b) y 7 d (c). Todas las formulaciones contenían citrato 10 mM pH 7,0, NaCl 25 mM. Se restó la densidad óptica de un control de tampón. Con sacarosa al 40 %, la formulación concentrada más alta contenía solo 60 mg/ml de husFc $\gamma$ RIIB y no 80 mg/ml.

Estos resultados se muestran en la Fig. 6. Con el aumento de la concentración de sacarosa (concentraciones crecientes de atrás hacia delante en el eje z en todos los diagramas de la figura 6), es decir, aumento de la temperatura de fusión de la proteína, el aumento de la turbidez se retrasa. Sin sacarosa añadida todas las formulaciones con una concentración  $\geq 10$  mg/ml de husFc $\gamma$ RIIB ya se habían vuelto turbias después de una hora a 37 °C, mientras que con sacarosa al 40% no se observó aumento significativo de la turbidez hasta 60 mg/ml de husFc $\gamma$ RIIB incluso después de siete días a 37 °C. Por encima de cierta concentración de proteína, la turbidez absoluta aumenta linealmente con el aumento de la concentración de husFc $\gamma$ RIIB, pero, por debajo de ese umbral, la

formación de agregados de proteínas insolubles es extremadamente lenta o incluso está inhibida. Con el aumento de las concentraciones de sacarosa, este umbral se desplaza a concentraciones más altas de husFc $\gamma$ RIIB, pero desde el punto de vista fisiológico se necesitarán altas concentraciones de sacarosa inaceptables para estabilizar husFc $\gamma$ RIIB a 37 °C y una concentración superior a 60 mg/ml.

- 5 Se llevó a cabo una prueba adicional para la estabilidad en condiciones aceleradas de formulaciones de husFc $\gamma$ RIIB tamponado con citrato a 40 °C. Los resultados se muestran en la Fig. 7. El aumento de la densidad óptica a 360 nm se midió a 10 mg/ml de husFc $\gamma$ RIIB en citrato 10 mM, NaCl 150 mM pH 7,0 suplementado con sacarosa al 10 %/292 mM (a,  $\Delta$ ), trehalosa al 10 %/292 mM (a,  $\square$ ), manitol al 5 %/274 mM (a,  $\bullet$ ), sacarosa al 30 %/876 mM (b,  $\Delta$ ), trehalosa al 30 %/876 mM (b,  $\square$ ), manitol al 15 %/822 mM (b,  $\bullet$ ). También se muestra el control del tampón  
10 suplementado con sacarosa al 20 % ( $\circ$ ).

Basándose en estas observaciones, se clasificaron diferentes azúcares y alditoles con respecto a su capacidad para suprimir la formación de agregados de proteínas insolubles. Como se muestra en la Fig. 7, el estabilizante más eficaz es la sacarosa.

#### e) Definición de la concentración de detergente requerida

- 15 Ensayos de turbidez (datos no mostrados) indicaron de acuerdo con los datos publicados (Timasheff, 1992, Capítulo 9. Stabilization of Protein Structure. En Stability of Protein Pharmaceuticals, Part B: In vivo pathways of degradation and strategies for protein stabilization. Ahern, T.J. & Manning, MC, eds., Plenum Press, New York, páginas 265-285) que el aumento de las concentraciones de detergente desestabiliza husFc $\gamma$ RIIB. También se especula que el uso de  
20 altas concentraciones de detergente puede dar lugar a una inmunogenicidad incrementada (Hermeling et al., 2003, Pharm. Res. **20**, 1903-1907). Por esta razón sería obligatorio mantener la concentración de detergente lo más baja posible sin comprometer su efecto estabilizante frente a la tensión superficial.

- Idealmente, la concentración de polisorbato 20 se fijaría al 0,005 %, la concentración que se utiliza para las formulaciones de husFc $\gamma$ RIIB líquidas ya establecidas que contienen 5–20 mg/ml de husFc $\gamma$ RIIB. Sin embargo, dado que la concentración de la formulación recién desarrollada estará por encima de 50 mg/ml y el polisorbato 20 puede  
25 unirse a la proteína, se cuestionó si la concentración de detergente debe elevarse por encima de un 0,005 %.

- Para probar la hipótesis de unión de detergente inespecífica por la proteína, se suministró una formulación tamponada con citrato que contenía polisorbato 20 al 0,005 % con concentraciones crecientes de husFc $\gamma$ RIIB y las soluciones se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y 60 °C, una temperatura muy por encima de la  $T_m$  determinada de husFc $\gamma$ RIIB. Después de que la proteína y el polisorbato 20 hipotéticamente unido se extrajeran  
30 mediante cromatografía de intercambio catiónico, se midió la cantidad de polisorbato libre. En la Fig. 8 se muestra un experimento que determina el polisorbato 20 libre en presencia de husFc $\gamma$ RIIB. husFc $\gamma$ RIIB en citrato 10 mM, NaCl 25 mM, sacarosa al 3 %, manitol al 1,5 %, polisorbato 20 al 0,005 %, pH 6,7 se incubó durante 1 h a 25 °C (husFc $\gamma$ RIIB nativo) y 60 °C (husFc $\gamma$ RIIB desnaturalizado). Después de que husFc $\gamma$ RIIB se extrajera mediante cromatografía de intercambio catiónico (CEX), se midió la cantidad de polisorbato 20 (a). El blanco representa  
35 tampón sin husFc $\gamma$ RIIB añadido o detergente. Las pruebas de idoneidad del sistema (SST) representan tampón con polisorbato 20 al 0,005 %, SST2 fue CEX tratado y SST1 no. El contenido de polisorbato medido a 0,08–0,72 mg/ml de husFc $\gamma$ RIIB se extrapola a concentraciones de husFc $\gamma$ RIIB superiores a 10 mg/ml por regresión lineal ( $R^2 > 0,998$ ) de la concentración de polisorbato en comparación con la concentración de husFc $\gamma$ RIIB logarítmica (b).

- Como se muestra en la Fig. 8, se estableció una relación lineal entre el contenido de polisorbato libre y la concentración de husFc $\gamma$ RIIB logarítmica. Por lo tanto, se espera que la concentración de polisorbato libre cambie solo marginalmente, en aprox. un 0,0001–0,0002 %, en caso de que la resistencia de la formulación se incremente de 20 a 100 mg/ml. La concentración de polisorbato significativamente menor en las muestras en comparación con el control a un 0,005 % se atribuye en gran medida al hecho de que las muestras se diluyeron con tampón de  
40 equilibrado CEX, que se preparó sin polisorbato 20, durante la carga de la columna (consúltese la Fig. 8 SST 1 frente a SST2).

#### f) Viscosidad de formulaciones de husFc $\gamma$ RIIB de alta concentración

- Las formulaciones de proteínas altamente concentradas se caracterizan por una alta viscosidad (Shire *et al.*, 2010, anteriormente). Por lo tanto, la capacidad de fabricación de una formulación de proteína altamente concentrada podría verse obstaculizada por su viscosidad, ya que el proceso de concentración por filtración de flujo tangencial  
50 puede llegar a ser inaceptablemente lenta. En un experimento adicional, la viscosidad en solución de husFc $\gamma$ RIIB en citrato 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0 se midió a 20 °C. Los datos experimentales, como se muestra en la Fig. 9 ( $\bullet$ ) se ajustaron a una función de crecimiento exponencial (-,  $R^2 > 0,992$ ) y encontró que la viscosidad de la solución de la formulación es lo suficientemente baja como para llevar a cabo procesos económicos TFF hasta al menos 210 mg/ml.

#### g) Liofilización de formulaciones que contienen husFc $\gamma$ RIIB

59 formulaciones con diferente contenido de husFc $\gamma$ RIIB, azúcar, sal y detergente se sometieron a un ciclo de

5 liofilización conservador. Los sólidos se reconstituyeron con un volumen de agua para inyectables que era igual o menor que el volumen original antes del proceso de liofilización. Al hacerlo, el contenido de  $\text{husFc}\gamma\text{RIIB}$  después de la reconstitución se ajustó a un contenido nominal de 60-180 mg/ml. Se evaluó la adecuación de las diversas formulaciones para la liofilización basándose en el tiempo de reconstitución y la contaminación con partículas después de la reconstitución. Se identificaron varias formulaciones que se pudieron reconstituir en menos de 2 min y ninguna mostró un aumento de la turbidez ni la formación de partículas en el intervalo visible y su-visible. Basándose en el cribado de liofilización descrito anteriormente, se demostró que las formulaciones ideales contenían bajas cantidades de  $\text{husFc}\gamma\text{RIIB}$  (por ejemplo, 15-60 mg/ml) antes de la liofilización y se reconstituyeron con bajos volúmenes de agua para inyectables, aumentando con ello la concentración final de detergente. La carga de partículas de las formulaciones seleccionadas, determinada por microscopía de fluorescencia, se muestra en la Fig. 10. Todas las formulaciones contenían citrato 5 mM pH 6,7 y la cantidad indicada de sal, azúcar y detergente. Las formulaciones se liofilizaron y reconstituyeron hasta el contenido de  $\text{husFc}\gamma\text{RIIB}$  indicado.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> SuppreMol GmbH

5 <120> Formulaciones altamente concentradas de receptores Fc solubles

<130> 0204-2930-PCT

<160> 1

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 177

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> SEQ ID NO:1

20 <222> (1)..(177)

<223> husFcgammaRIIB

<400> 1

Met Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn  
 1 5 10 15

Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Gly Thr His Ser  
 20 25 30

Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro  
 35 40 45

Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asp Ser  
 50 55 60

Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val  
 65 70 75 80

His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu  
 85 90 95

Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys His Ser Trp Lys  
 100 105 110

Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys  
 115 120 125

Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His  
 130 135 140

Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu  
 145 150 155 160

Tyr Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Ser Ser Ser  
 165 170 175

25 Pro



**REIVINDICACIONES**

1. Formulaci3n que contiene un receptor Fc $\gamma$  soluble (sFc $\gamma$ R) en una soluci3n acuosa tamponada en la que la concentraci3n del receptor Fc $\gamma$  soluble es superior a 60 mg/ml y contiene una sustancia tamp3n fisiol3gicamente aceptable.
- 5 2. Formulaci3n de acuerdo con la reivindicaci3n 1, en la que la sustancia tamp3n se selecciona de histidina, citrato, fosfato o cualquier combinaci3n de los mismos.
3. Formulaci3n de acuerdo con la reivindicaci3n 1 o 2, en la que el receptor es un receptor Fc $\gamma$ RII, preferentemente Fc $\gamma$ RIIb.
- 10 4. Formulaci3n de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la concentraci3n del receptor Fc $\gamma$  es superior a 80 mg/ml, preferentemente mayor que 100 mg/ml, m1s preferentemente mayor que 150 mg/ml y m1s preferentemente mayor que 200 mg/ml.
5. Formulaci3n de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que contiene otras sustancias seleccionadas de az1cares, sales y detergentes.
- 15 6. Formulaci3n de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el receptor est1 presente en forma disuelta o la formulaci3n contiene el receptor en una forma microcristalina.
7. Formulaci3n de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6, en la que es una soluci3n tamponada con citrato y el pH de la formulaci3n se ajusta de 6,0 a 7,5.
8. Formulaci3n de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6, en la que es una soluci3n tamponada con histidina y el pH se ajusta de 5,2 a 5,9.
- 20 9. Formulaci3n de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que contiene el receptor en una forma cristalina.
10. Formulaci3n de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 y 9, en la que es una soluci3n tamponada con citrato y su pH se ajusta de 5,2 a 5,9.
- 25 11. Formulaci3n de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 y 9, en la que es una soluci3n tamponada con histidina y su pH se ajusta de 6,0 a 7,5.
12. Composici3n farmac3utica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de reivindicaciones 1 a 11, opcionalmente en combinaci3n con excipientes y/o adyuvantes y/o veh1culos farmac3uticamente aceptables.
- 30 13. Composici3n farmac3utica de acuerdo con la reivindicaci3n 12 para la inyecci3n subcut1nea de una cantidad eficaz de un receptor Fc $\gamma$  para uso en la prevenci3n o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias o enfermedades inflamatorias.
14. Formulaci3n de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o una composici3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones 12 o 13 para uso en el tratamiento o prevenci3n de enfermedades autoinmunitarias, en particular esclerosis m1ltiple, lupus eritematoso sist3mico, artritis reumatoide, trombocitopenia inmunitaria primaria o anemia hematl3tica autoinmunitaria.

35

Figura 1

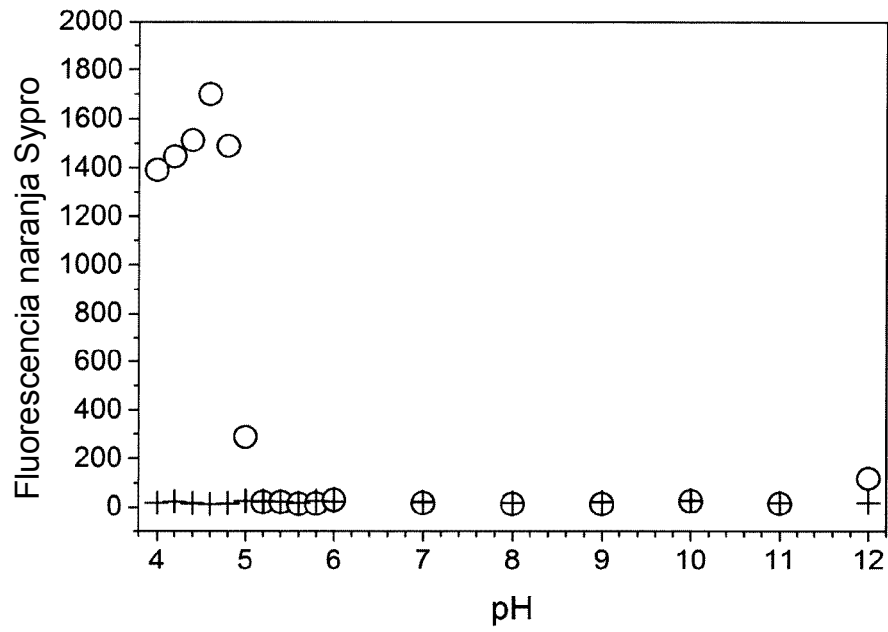


Figura 2

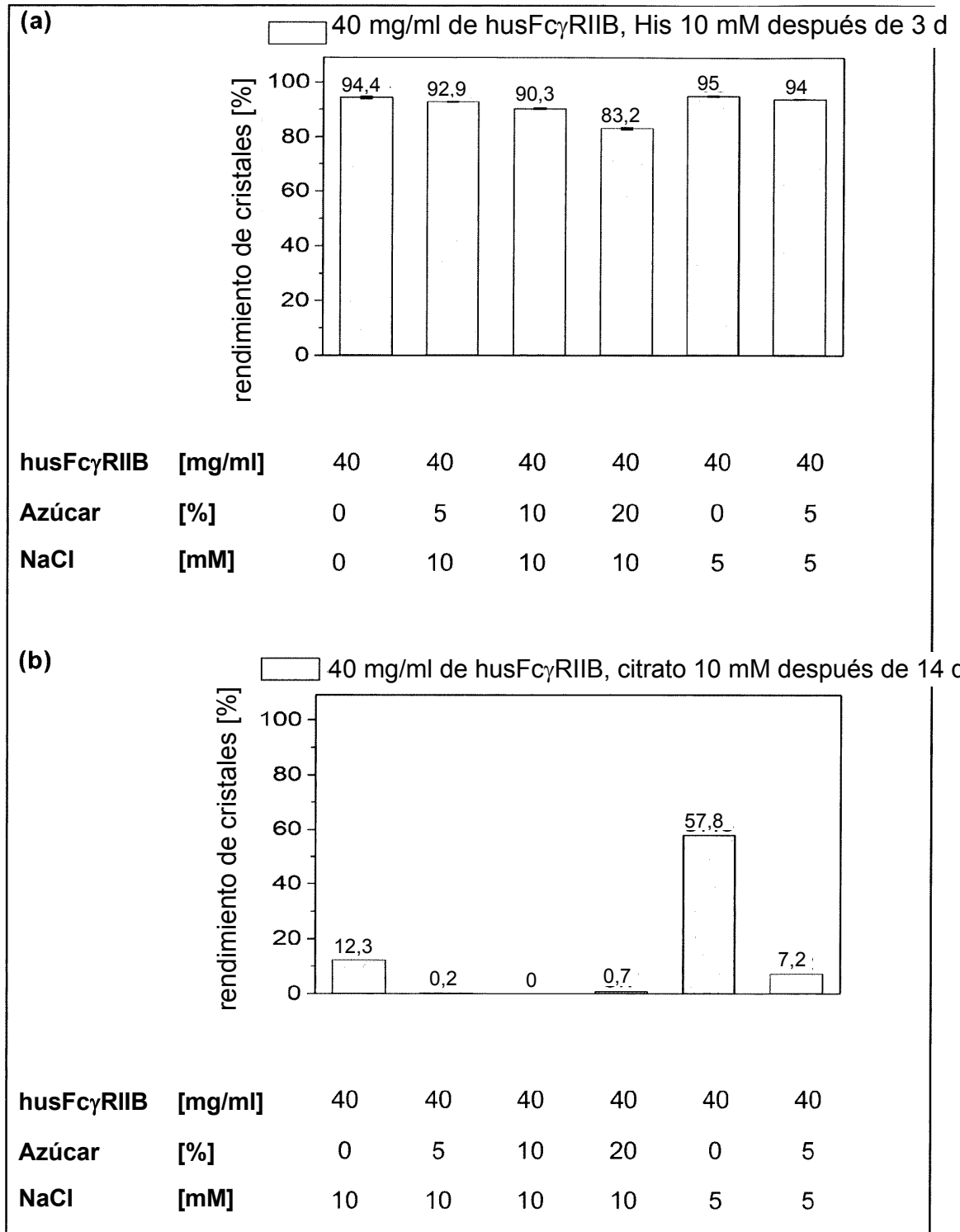


Figura 3

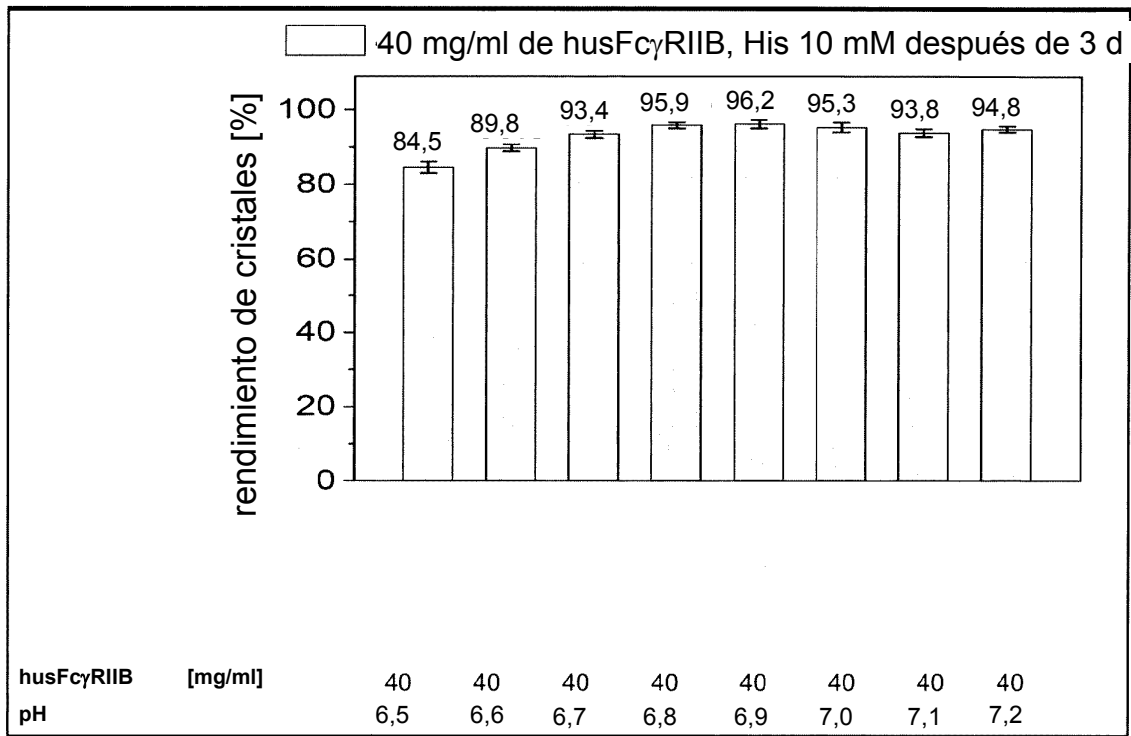
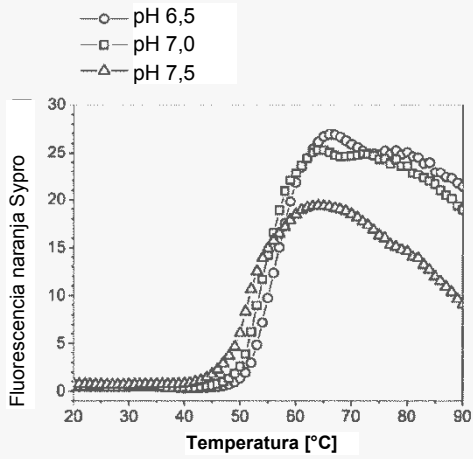
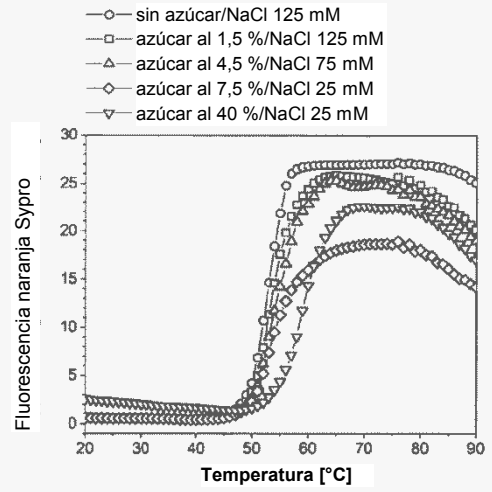


Figura 4

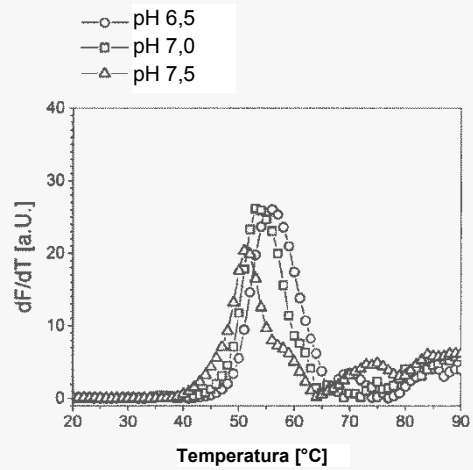
(a)



(b)



(c)



(d)

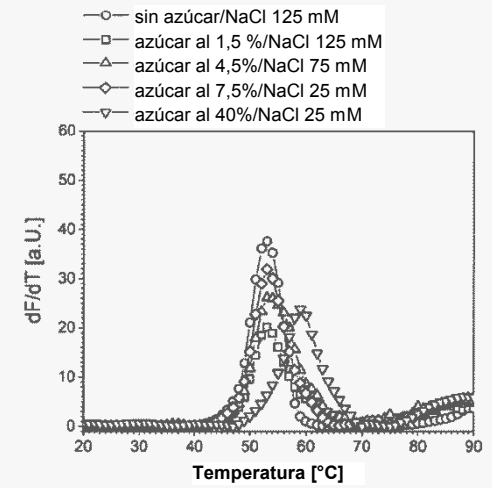


Figura 5

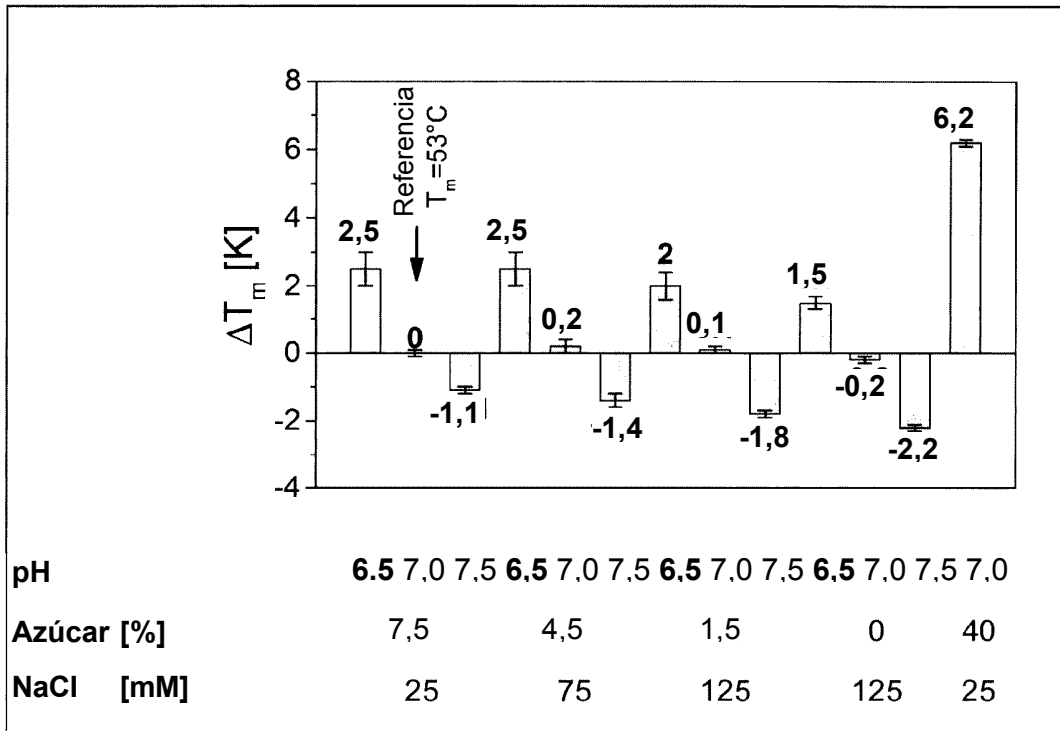


Figura 6

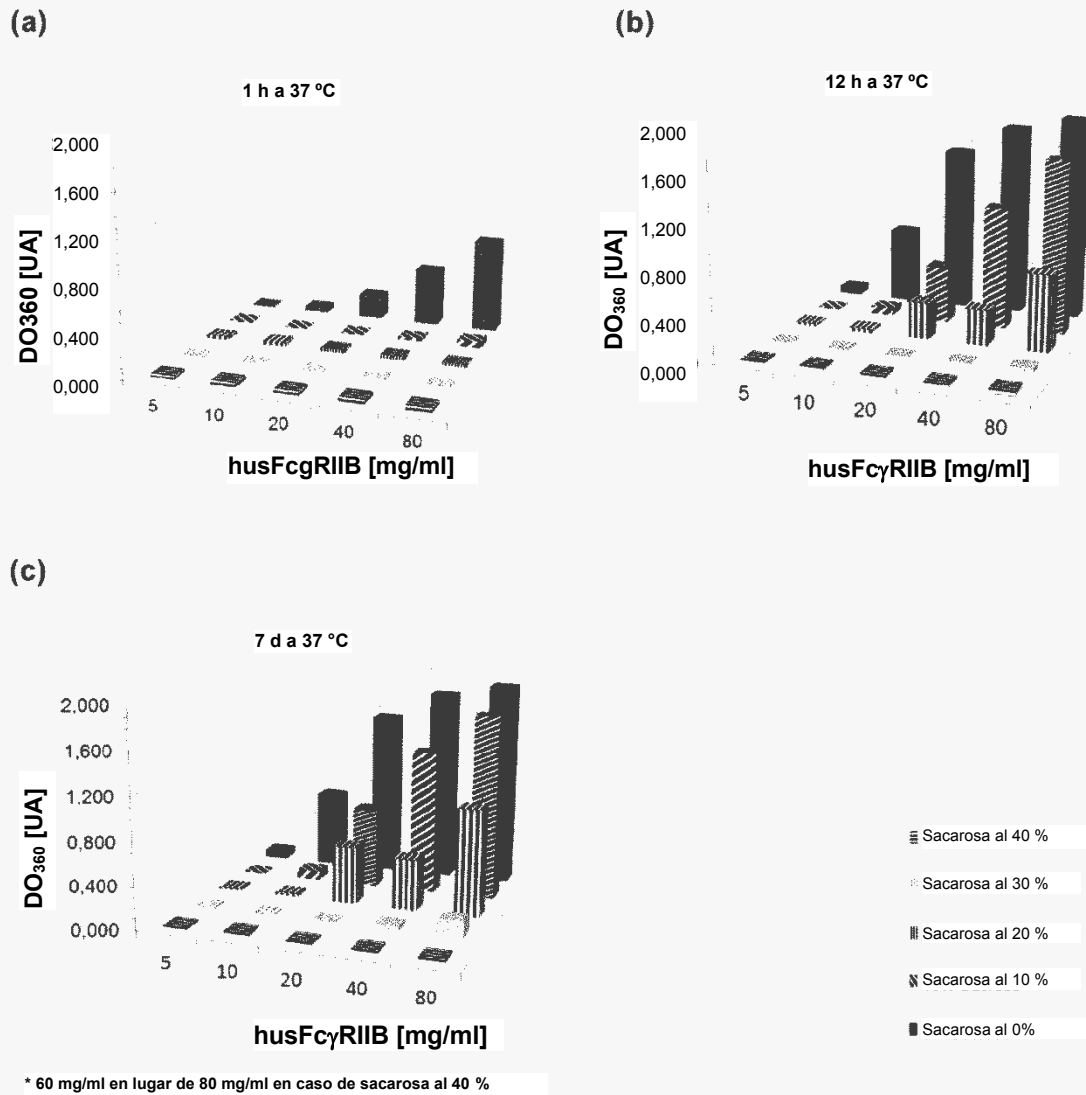
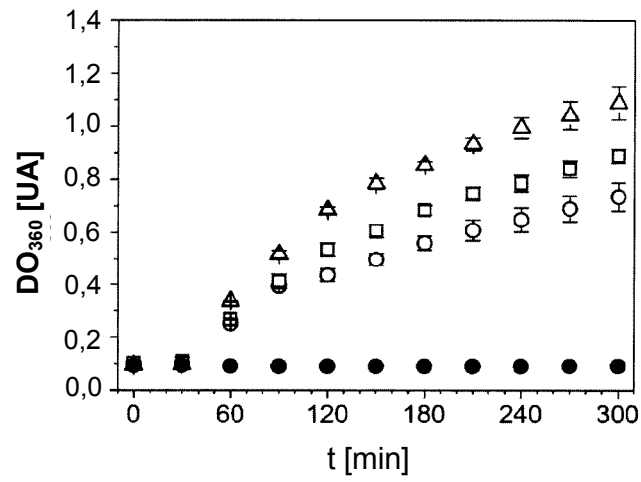


Figura 7

(a)



(b)

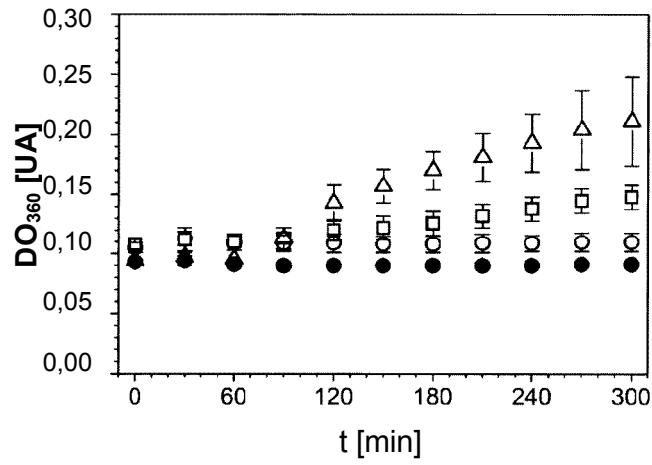




Figura 8

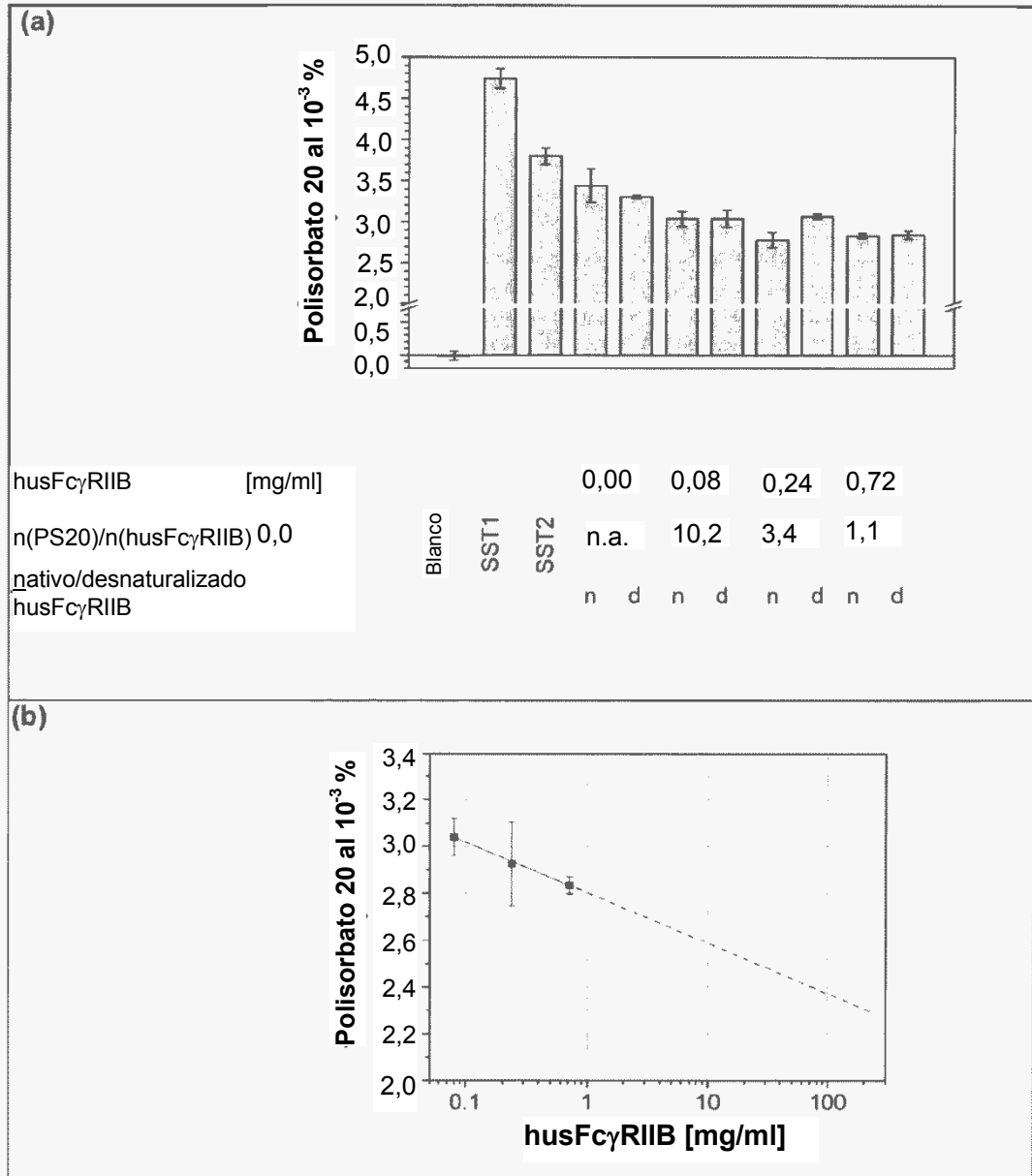


Figura 9

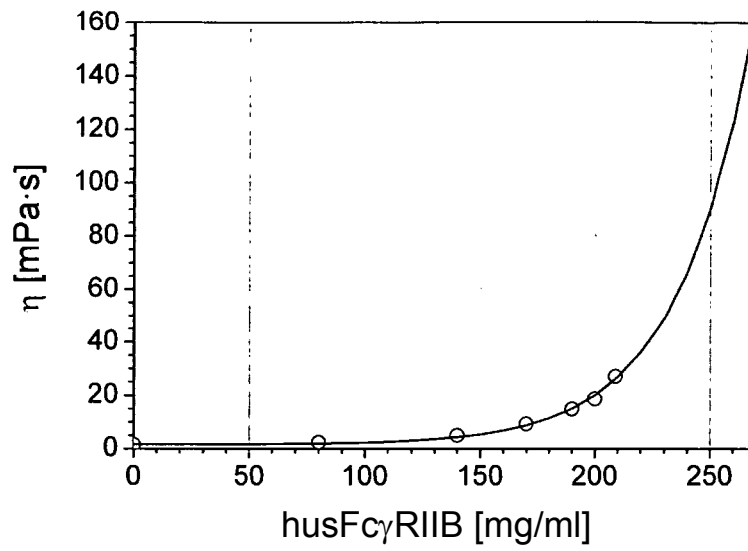
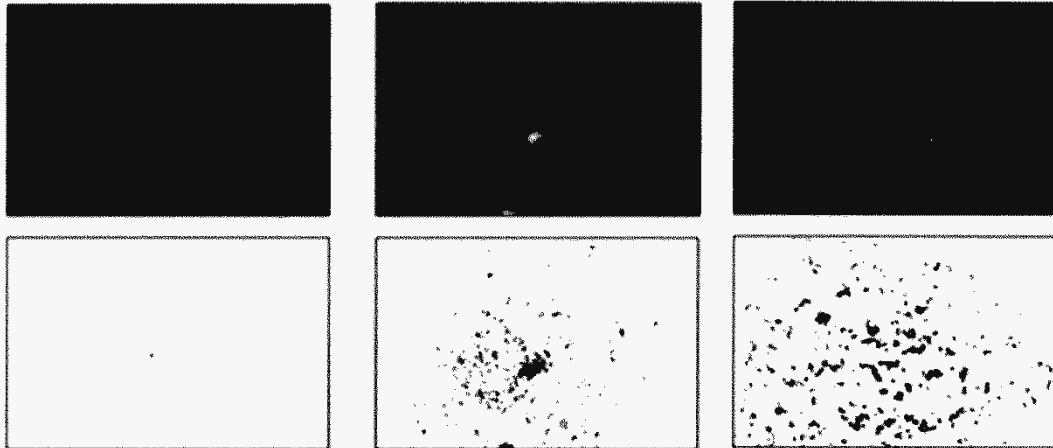


Figura 10



45 ⇒ 180 mg/mL  
Sacarosa al 2 %  
NaCl 25 mM  
PS20 al 0,005 %

120 ⇒ 120 mg/mL  
Trehalosa al 8 %  
NaCl 25 mM  
PS20 al 0,005 %

60 ⇒ 60 mg/mL  
Sacarosa al 2%  
Manitol al 1 %  
NaCl 25 mM  
PS20 al 0,005 %