

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 574**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 47/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2006 E 13152402 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2017 EP 2586459**

54 Título: **Formulaciones de antagonistas de VEGF**

30 Prioridad:

25.03.2005 US 665125 P

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

22.09.2017

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591-6707, US**

72 Inventor/es:

**DIX, DANIEL;
FRYE, KELLY y
KAUTZ, SUSAN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 633 574 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 de antagonistas de VEGF

5 Campo de la invención

La presente invención se dirige a formulaciones farmacéuticas que comprenden agentes capaces de inhibir al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). La invención incluye formulaciones farmacéuticas que tienen estabilidad aumentada.

10

Estado de la técnica relacionada

La expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es prácticamente ubicua en cáncer humano, en consistencia con su papel como un mediador clave de la neoangiogénesis tumoral. El bloqueo de la función de VEGF, mediante la unión a la molécula o su receptor VEGFR-2, inhibe el crecimiento de las células tumorales implantadas en múltiples modelos de xenotrasplantes (véase, por ejemplo, Gerber *et al.* (2000) *Cancer Res.* 60:6253-6258). Se ha descrito una proteína de fusión antagonista soluble específica de VEGF, denominada una "Trampa de VEGF" (Kim *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99: 11399-404; Holash *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:11393-8).

15

La liofilización (desechado por congelación bajo condiciones controladas) se usa comúnmente para el almacenamiento a largo plazo de proteínas. La proteína liofilizada es sustancialmente resistente a la degradación, agregación, oxidación y otros procesos degenerativos mientras se encuentra en estado liofilizado (véase, por ejemplo, el documento U.S. 6.436.897).

20

Los siguientes documentos también se refieren a:

- El documento WO 2005/000895 que se refiere a las Trampas de VEGF y a los usos terapéuticos de las mismas;
- Fraser *et al.* (2004) *J. Clin. Endocrinology & Metabolism*, 90(2): 1114-1122 que concierne a inyecciones simples de una trampa de factor de crecimiento endotelial vascular que bloquea la ovulación;
- El documento US 2005/032699 que concierne a una composición de un antagonista de VEGF y un agente anti-proliferativo;
- El documento WO 02/060489 que concierne a un método para usar una variante del receptor de VEGF para tratar la psoriasis y para potenciar la curación de heridas; y
- El documento US 2003/202972 que concierne a un método de administración y de uso de los inhibidores de VEGF para el tratamiento del cáncer.

25

Breve resumen de la invención

En el presente documento se proporcionan formulaciones estables de una proteína de fusión específica antagonista de VEGF. Las formulaciones farmacéuticamente aceptables de la invención comprenden la "trampa" antagonista de VEGF con un transportador farmacéuticamente aceptable tal como se define en las reivindicaciones.

40

La invención proporciona una formulación farmacéutica líquida estable de un antagonista de una proteína de fusión antagonista específica de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que comprende una proteína de fusión que consiste en los aminoácidos 27-457 de la SEQ ID NO:4 y restos de Asn glucosilados en las posiciones 62, 94, 149, 222 y 308, tampón fosfato 5 mM, tampón citrato 5 mM, NaCl 100 mM, polisorbato 20 al 0,1 %, sacarosa al 20 % y 25 mg/ml de la proteína de fusión, a un pH de 6,0-6,1.

45

La invención además proporciona una formulación preliofilizada que comprende (i) 5-75 mg/ml de un antagonista de una proteína de fusión específica de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que consiste en los aminoácidos 27-457 de la SEQ ID NO:4 y los restos de Asn glucosilados en las posiciones 62, 94, 149, 222 y 308, (ii) un tampón de histidina que comprende histidina 5-50 mM, (iii) polietilenglicol (PEG) al 0,1-3,0 %, (iv) glicina al 0,25-3,0 % y (v) sacarosa al 0,5-6,0 % a un pH de 6,0-6,5. En una realización, la formulación preliofilizada de la invención no contiene un conservante.

50

55

En cualquier realización, la formulación preliofilizada puede comprender adicionalmente hasta 0,05 mM de citrato y/o polisorbato al 0,003-0,005 %. El polisorbato presente puede ser, por ejemplo, polisorbato 20.

En una realización más específica, la formulación pre-lío-filizada comprende aproximadamente 10 mM de histidina, PEG 3350 aproximadamente al 1,5 %, glicina aproximadamente al 0,75 %, sacarosa aproximadamente al 2,5 %, y aproximadamente de 12, a 75 mg/ml de proteína de fusión específica de VEGF, a un pH de aproximadamente 6,25. En realizaciones separadas, la formulación reconstituida es 2 veces la concentración de la formulación preliofilizada, por ejemplo, una formulación preliofilizada de 20 mg de proteína de fusión/ml se reconstituye a una formulación final de 60 mg de proteína de fusión/ml. Generalmente, la formulación liofilizada se reconstituye con agua estéril adecuada para la inyección. En una realización, el líquido reconstituyente puede ser agua bacteriostática.

60

65

La invención proporciona adicionalmente un método para producir una formulación farmacéutica liofilizada reconstituida de un antagonista de proteína de fusión específica de VEGF, que comprende reconstituir la formulación liofilizada descrita con líquido, en donde se genera una formulación farmacéutica liofilizada reconstituida. La formulación liofilizada se puede liofilizar mediante cualquier método conocido en la materia para liofilizar un líquido.

La invención proporciona adicionalmente un método para producir una formulación farmacéutica liofilizada reconstituida de un antagonista de proteína de fusión específica de VEGF, que comprende reconstituir la formulación liofilizada descrita con líquido, en donde se genera una formulación farmacéutica liofilizada reconstituida. En una realización, la formulación reconstituida es dos veces la concentración de la formulación preliofilizada, por ejemplo, el método de la divulgación comprende: (a) producir una formulación preliofilizada de un antagonista de proteína de fusión específica de VEGF, (b) someter la formulación preliofilizada de la etapa (a) a liofilización; y (c) reconstituir la formulación liofilizada de la etapa (b).

En realizaciones específicas del método de producción de una formulación liofilizada reconstituida, está presente una solución preliofilizada en un frasco como una solución de 25 mg de antagonista de proteína de fusión específica de VEGF por ml de formulación preliofilizada, que está liofilizada y reconstituida a una solución de 50 mg/ml. En otra realización, se liofiliza una solución preliofilizada de 30 mg/ml y se reconstituye a una solución de 60 mg/ml. En otra realización, se liofiliza una solución preliofilizada de 40 mg/ml y se reconstituye a una solución de 80 mg/ml. En otra realización, se liofiliza una solución preliofilizada de 12,5 mg/ml y se reconstituye a una solución de 25 mg/ml. En otra realización, se liofiliza una solución preliofilizada de 50 mg/ml y se reconstituye a una solución de 100 mg/ml. En otra realización, se liofiliza una solución preliofilizada de 75 mg/ml y se reconstituye a una solución de 150 mg/ml. Preferentemente, la formulación liofilizada reconstituida no contiene un conservante.

Descripción detallada de la Invención

Descripción general

El manejo seguro y la administración de las formulaciones que comprenden proteínas representan retos significativos para los formuladores farmacéuticos. Las proteínas poseen propiedades químicas y físicas únicas que presentan problemas de estabilidad: existe una variedad de rutas de degradación para las proteínas, implicando tanto la inestabilidad química como la física. La inestabilidad química incluye la desaminación, agregación, el recorte de la estructura peptídica y la oxidación de los restos de metionina. La inestabilidad física abarca muchos fenómenos, incluyendo, por ejemplo, la agregación.

La estabilidad química y física se puede promover mediante la retirada de agua de la proteína. La liofilización (desechado por congelación bajo condiciones controladas) se usa frecuentemente para el almacenamiento a largo plazo de proteínas. La proteína liofilizada es sustancialmente resistente a la degradación, agregación, oxidación y otros procesos degenerativos mientras se encuentra en estado liofilizado. La proteína liofilizada se reconstituye normalmente con agua que contiene de manera opcional un conservante bacteriostático (por ejemplo, alcohol de bencilo) antes de su administración.

Definiciones

La expresión "liofilizado" o "desechado por congelación" incluye un estado de una sustancia que se ha sometido a un proceso de secado tal como liofilización, donde al menos se ha eliminado el 50 % de la humedad.

La frase "agente de carga" incluye un compuesto que es farmacéuticamente aceptable y que añade carga a la mezcla de liofilización. Generalmente, los agentes de carga aceptables conocidos en la materia incluyen, por ejemplo, hidratos de carbono, incluyendo azúcares sencillos tales como dextrosa, ribosa, fructosa y similares, azúcares de alcohol tales como manitol, inositol y sorbitol, disacáridos que incluyen trehalosa, sacarosa y lactosa, polímeros de origen natural tales como almidón, dextranos, quitosano, hialuronato, proteínas (por ejemplo, gelatina y albúmina de suero), glucógeno y monómeros y polímeros sintéticos. En las formulaciones de la publicación, PEG 3350 es un codisolvente orgánico que se usa para estabilizar la proteína de fusión cuando se agita, se mezcla o se manipula, y como agente de carga para ayudar a producir una carga aceptable.

El término "lioprotector" incluye una sustancia que se puede añadir a una formulación desecada por congelación o liofilizada para ayudar a mantener la estructura de la proteína cuando se deseca por congelación o se liofiliza.

Un "conservante" incluye un compuesto bacteriostático, bactericida, fungistático o fungicida que se añade generalmente a formulaciones para retardar o eliminar el crecimiento de bacterias u otros microorganismos contaminantes en las formulaciones. Los conservantes incluyen, por ejemplo, alcohol de bencilo, fenol, cloruro de benzalconio, m-cresol, timerosal, clorobutanol, metilparabeno, propilparabeno y similares. Otros ejemplos de conservantes farmacéuticamente aceptables se pueden encontrar en la USP.

Antagonistas del VEGF

Un antagonista de VEGF es un compuesto que puede bloquear o inhibir la acción biológica del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), e incluye proteínas de fusión capaces de atrapar a VEGF. La proteína de fusión usada en la formulación de la invención comprende los aminoácidos de 27-457 de SEQ ID NO:4 y está glucosilada en los restos de Asn 62, 94, 149, 222 y 308. En realizaciones específicas, el antagonista de VEGF se expresa en una línea celular de mamífero tal como una célula CHO y se modifica de manera postraduccional.

El antagonista de VEGF puede prepararse por cualquier método conocido en la materia o que será conocido.

El antagonista de VEGF está preferentemente sustancialmente libre de proteínas contaminantes en el momento en el que se usa para preparar la formulación farmacéuticamente aceptable. Por "sustancialmente libre de proteínas contaminantes" se entiende, preferentemente, que al menos el 90 % del peso de la preparación proteína de fusión antagonista específica de VEGF usada para realizar una formulación es una proteína de fusión antagonista de VEGF, más preferentemente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 99 %. La proteína de fusión está preferentemente sustancialmente libre de agregados. "Sustancialmente libre de agregados" significa que al menos el 90 % del peso de la proteína de fusión no está presente en un agregado en el momento en el que la proteína de fusión se usa para preparar la formulación farmacéuticamente eficaz. La proteína de fusión puede contener cantidades bajas o traza de compuestos como resultado del proceso de purificación, por ejemplo, cantidades bajas o traza de citrato y/o polisorbato.

Liofilización y formulaciones liofilizadas

Las formulaciones liofilizadas se pueden reconstituir en soluciones, suspensiones, emulsiones o cualquier otra forma adecuada para su administración o su uso. Las formulaciones liofilizadas se preparan en primer lugar como líquidos, después se congelan y se liofilizan. El volumen de líquido total antes de la liofilización puede ser menor que, igual a, o mayor que, el volumen reconstituido final de la formulación liofilizada. El proceso de liofilización es bien conocido por los expertos en la materia, y típicamente incluye la sublimación de agua de una formulación congelada bajo condiciones controladas.

Las formulaciones liofilizadas se pueden almacenar en un amplio intervalo de temperaturas. Las formulaciones liofilizadas se pueden almacenar por debajo de los 25 °C, por ejemplo, refrigeradas a 4 °C o a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 25 °C). Preferentemente, las formulaciones liofilizadas se almacenan por debajo de aproximadamente 25 °C, más preferentemente, a aproximadamente 4-20 °C; por debajo de aproximadamente 4 °C; por debajo de aproximadamente -20 °C; aproximadamente -40 °C; aproximadamente -70 °C o aproximadamente -80 °C.

Las formulaciones liofilizadas típicamente se reconstituyen para su uso mediante la adición de una solución acuosa para disolver la formulación liofilizada. Se puede usar una amplia variedad de soluciones acuosas para reconstituir una formulación liofilizada. Preferentemente, las formulaciones liofilizadas se reconstituyen usando agua. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyen preferentemente con una solución que consiste esencialmente en agua (por ejemplo, WFI de la USP, o agua para inyección) o agua bacteriostática (por ejemplo, WFI de la USP con alcohol de bencilo al 0,9 %). Sin embargo, también se pueden usar las soluciones que comprenden tampones y/o excipientes y/o uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

Las formulaciones de desecado por congelación o liofilizadas se preparan típicamente a partir de líquidos, es decir, a partir de soluciones, suspensiones, emulsiones y similares. Por lo tanto, el líquido que se somete a desecado por congelación preferentemente comprende todos los componentes deseados en una formulación líquida reconstituida final. Como resultado, cuando se reconstituye, la formulación desecada por congelación o liofilizada producirá una formulación líquida deseada tras la reconstitución. Las formulaciones desecadas por congelación o liofilizadas comprenden histidina, dado que la histidina, en comparación con el fosfato, es más eficaz en la estabilización de la proteína de fusión cuando se liofiliza la proteína de fusión. Los codisolventes orgánicos tales como PEG 3350 se usan para estabilizar la proteína de fusión cuando se agita, se mezcla o se manipula. Preferentemente se usa un lioprotector en formulaciones desecadas por congelación o liofilizadas. Los lioprotectores ayudan a mantener la estructura secundaria de las proteínas cuando se desecan por congelación o se liofilizan. Dos ejemplos preferidos de lioprotectores son glicina y sacarosa, que preferentemente se usan juntos.

Formulaciones líquidas estables

La invención proporciona una formulación farmacéutica líquida estable tal como se define anteriormente.

Se ha establecido una combinación de NaCl y sacarosa para estabilizar la proteína de fusión más eficazmente que cualquiera de los estabilizantes individuales por separado.

Se determina la estabilidad de una serie de modos en momentos especificados, incluyendo la determinación del pH, la inspección visual del color y la apariencia, la determinación del contenido de proteína total por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, espectroscopia UV, SDS-PAGE, HPLC de exclusión molecular, bioensayo de la

determinación de la actividad, isoelectroenfoco y cuantificación de isoaspartato. En un ejemplo de bioensayo útil para determinar la actividad del antagonista de la actividad de VEGF, se usa una línea celular BAF/3 VEGFR1/EPOR para determinar la unión a VEGF165.

- 5 Las formulaciones, tanto si son líquidas como desecadas por congelación o liofilizadas, pueden almacenarse en un ambiente privado de oxígeno. Los ambientes privados de oxígeno pueden generarse mediante el almacenamiento de las formulaciones con un gas inerte tal como por ejemplo, argón, nitrógeno o helio.

Ejemplos

10

Ejemplo 1. Estabilidad de una Formulación Líquida de una Trampa de VEGF a 50 mg/ml

15

Una formulación líquida que contiene fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, polisorbato 20 al 0,1 %, sacarosa al 20 % y 50 mg/ml de trampa de VEGF (SEQ ID NO:4), pH 6,25, se almacenó a 5 °C y se ensayaron las muestras a los 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses. Se determinó la estabilidad mediante SE-HPLC. Los resultados, mostrados en la Tabla 1, muestran que el 98,6 % y el 98,3 % de la proteína de la trampa de VEGF permanecía intacta (no degradada) a los 12 y 24 meses, respectivamente. La turbidez se midió a una DO₄₀₅ nm, y el porcentaje de proteína recuperada por HPLC de exclusión molecular.

20

Tabla 1. Estabilidad de la Proteína de la Trampa de VEGF a 50 mg/ml Cuando se Almacena a 5 °C (VGFT-SS065)

Meses	Apariencia Visual	Turbidez	pH	% de Trampa de VEGF recuperada	% de Trampa de VEGF con Configuración Nativa
0	Pasada	0,00	6,2	100	99,0
3	Pasada	0,00	6,2	102	98,8
6	Pasada	0,01	6,2	103	98,7
9	Pasada	0,01	6,3	102	98,2
12	Pasada	0,01	6,3	106	98,6
18	Pasada	0,00	6,3	103	98,4
24	Pasada	0,00	6,2	93	98,3

25

Una formulación líquida que contenía fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, PEG 3350 al 3 %, sacarosa al 20 % y 50 mg/ml de trampa de VEGF (SEQ ID NO:4), pH 6,25, se almacenó a 5 °C y se ensayaron las muestras a los 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses. En la Tabla 2 se muestran los resultados de estabilidad.

Tabla 2. Estabilidad de la Proteína de la Trampa de VEGF a 50 mg/ml Cuando se Almacena a 5 °C (VGFT-SS065)

Meses	Apariencia Visual	Turbidez	pH	% de Trampa de VEGF recuperada	% de Trampa de VEGF con Configuración Nativa
0	Pasada	0,00	6,2	100	99,0
3	Pasada	0,00	6,2	100	98,8
6	Pasada	0,01	6,3	103	98,5
9	Pasada	0,00	6,3	103	98,3
12	Pasada	0,01	6,3	110	98,3
18	Pasada	0,00	6,3	113	98,0
24	Pasada	0,01	6,2	90	97,8

30

Ejemplo 2. Estabilidad de una Formulación Líquida de una Trampa de VEGF a 75 mg/ml

Una formulación líquida que contenía fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, Polisorbato 20 al 0,1 %, sacarosa al 20 %, y 75 mg/ml de trampa de VEGF (SEQ ID NO:4), pH 6,25, se almacenó a 5 °C y se ensayaron las muestras a los 0, 1, 2,3, 3, 9, 12 y 15 meses. En la Tabla 3 se muestran los resultados de estabilidad.

35

Tabla 3. Estabilidad de la Proteína de la Trampa de VEGF a 75 mg/ml Cuando se Almacena 5 °C (VGFT-SS101)

Meses	Apariencia Visual	Turbidez	pH	% de Trampa de VEGF recuperada	% de Trampa de VEGF con Configuración Nativa
0	Pasada	0,00	6,2	100	97,1
1	Pasada	0,00	6,2	96	97,0
2,3	Pasada	0,00	6,2	98	96,7
3	Pasada	0,00	6,2	97	96,1
9	Pasada	-0,01	6,0	101	96,0
12	Pasada	0,00	6,3	110	94,5
15	Pasada	0,00	6,3	92	95,6

5 Una formulación líquida que contenía fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, PEG 3350 al 3 %, sacarosa al 20 % y 75 mg/ml de trampa de VEGF (SEQ ID NO:4), pH 6,25, se almacenó a 5 °C y se ensayaron las muestras a los 0, 1, 2,3, 3, 9, 12 y 15 meses. En la Tabla 4 se muestran los resultados de estabilidad.

Tabla 4. Estabilidad de la Proteína de la Trampa de VEGF a 75 mg/ml Cuando se Almacena a 5 °C (VGFT-SS101)

Meses	Apariencia Visual	Turbidez	pH	% de Trampa de VEGF recuperada	% de Trampa de VEGF con Configuración Nativa
0	Pasada	0,00	6,2	100	96,8
1	Pasada	0,00	6,2	99	96,7
2,3	Pasada	0,00	6,2	97	96,3
3	Pasada	0,00	6,2	89	95,6
9	Pasada	-0,01	6,2	98	95,4
12	Pasada	-0,01	6,3	112	94,1
15	Pasada	0,00	6,3	98	94,8

10

Ejemplo 3. Estabilidad de una Formulación Líquida de una Trampa de VEGF a 100 mg/ml

15 Una formulación líquida que contenía fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, Polisorbato 20 al 0,1 %, sacarosa al 20 %, y 100 mg/ml de trampa de VEGF (SEQ ID NO:4), pH 6,25, se almacenó a 5 °C y se ensayaron las muestras a los 0, 1, 2,3, 3, 9, 12 y 15 meses. En la Tabla 5 se muestran los resultados de estabilidad.

Tabla 5. Estabilidad de la Proteína de la Trampa de VEGF a 100 mg/ml Almacenada a 5 °C (VGFT-SS101)

Meses	Apariencia Visual	Turbidez	pH	% de Trampa de VEGF recuperada	% de Trampa de VEGF con Configuración Nativa
0	Pasada	0,00	6,3	100	96,7
1	Pasada	0,00	6,2	92	96,6
2,3	Pasada	0,00	6,2	92	96,2
6	Pasada	0,00	6,2	99	95,5
9	Pasada	-0,01	6,2	92	95,5
12	Pasada	-0,01	6,2	110	93,9
15	Pasada	0,00	6,3	108	94,8

20 Una formulación líquida que contenía fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, PEG 3350 al 3 %, sacarosa al 20 % y 100 mg/ml de trampa de VEGF (SEQ ID NO:4), pH 6,25, se almacenó a 5 °C y se ensayaron las muestras a los 0, 1, 2,3, 3, 9, 12 y 15 meses. En la Tabla 6 se muestran los resultados de estabilidad.

Tabla 6. Estabilidad de la Proteína de la Trampa de VEGF a 100 mg/ml Almacenada a 5 °C (VGFT-SS101)

Meses	Apariencia Visual	Turbidez	pH	% de Trampa de VEGF recuperada	% de Trampa de VEGF con Configuración Nativa
0	Pasada	0,00	6,3	100	96,5
1	Pasada	0,01	6,2	94	96,2
2,3	Pasada	0,01	6,2	93	95,7
6	Pasada	0,01	6,2	102	94,6
9	Pasada	0,00	6,2	95	94,6
12	Pasada	0,00	6,3	96	92,8
15	Pasada	0,01	6,3	102	93,9

Ejemplo 4. Realizaciones Adicionales de Formulaciones de Trampa Estable de VEGF

5 En una realización, la divulgación proporciona formulaciones líquidas estables de proteína de fusión de unión a VEGF (trampa de VEGF) que comprende fosfato 5 mM, citrato 5 mM, NaCl 100 mM, polisorbato 20 al 0,1 %, sacarosa al 20 %, 25 mg/ml de proteína de trampa de VEGF, a pH 6,0. Esta formulación se puede suministrar por vía subcutánea o diluir y suministrar mediante infusión intravenosa. Debido a la elevada osmolalidad de esta formulación, se diluye 3 veces para lograr una solución isosmolar para administración intravenosa. Los estudios de estabilidad demostraron que se detectó aproximadamente menos del 1 % de degradación tras tres años de almacenamiento a 2-8 °C.

15 También se hace referencia a una formulación liofilizada que está preferentemente concentrada dos veces desde la formulación preliofilizada hasta la postliofilizada, por ejemplo, de 50 a 100 mg/ml; de 75 a 150 mg/ml, o de 100 a 200 mg/ml de proteína de trampa de VEGF. En una realización específica, la formulación preliofilizada comprende histidina 10 mM, PEG 3350 al 1,5 %, glicina al 0,75 %, sacarosa al 2,5 %, 50 mg/ml de proteína de trampa de VEGF, a pH 6,3 y se reconstituye a una formulación que comprende histidina 20 mM, PEG 3350 al 3 %, glicina al 1,5 %, sacarosa al 5 %, 100 mg/ml de proteína de trampa de VEGF a pH a 6,3. El estudio de estabilidad no demostró detección de degradación de la trampa de VEGF tras 6 meses de almacenamiento a 2-8 °C.

20 También se hace referencia a una formulación que comprende histidina 10 mM, NaCl 50 mM, sacarosa al 5-20 %, 50-100 mg/ml de trampa de VEGF, y uno de polisorbato al 0,1 % o PEG 3350 al 3 %. Una ventaja de esta formulación líquida es que esta proporciona una concentración más alta de trampa de VEGF sin la necesidad de fabricar un producto liofilizado. Por lo tanto, esta formulación proporciona facilidad para la administración subcutánea, por ejemplo, permitiendo el suministro de una jeringuilla rellena con anterioridad de líquido a una concentración más alta que la administrada por infusión IV. Así mismo, esta formulación podría usarse ventajosamente para proporcionar volúmenes de infusión más bajos y tiempos de infusión más cortos. La cantidad de degradación determinada por SE-HPLC después de la incubación a 5 °C durante hasta 15 o 25 meses se resume en la Tabla 7.

Tabla 7. Estabilidad de Formulación Líquida con 50-100 mg/ml de Trampa de VEGF (VGFT-SS101)

Incubación (meses)	Trampa de VEGF (mg/ml)	% de Polisorbato 20	% de PEG 3350	% de Degradación
24	50	0,1	-	0,7
24	50	-	3	1,3
15	75	0,1	-	1,5
15	75	-	3	2,0
15	100	0,1	-	1,9
15	100	-	3	2,6

Ejemplo 5. Estabilidad y actividad de liofilizado y líquido

35 La estabilidad de una formulación liofilizada reconstituida se determinó durante un período de 6 meses. La formulación preliofilizada contenía histidina 10 mM, PEG 3350 al 1,5 %, sacarosa al 2,5 %, glicina al 0,75 % y 50 mg/ml de proteína de trampa de VEGF. Tras la liofilización, la formulación reconstituida contenía histidina 20 mM, PEG 3350 al 3 %, sacarosa al 5 %, glicina al 1,5 % y 100 mg/ml de proteína de trampa de VEGF (SEQ ID NO:4). Los resultados se muestran en la Tabla 8. La actividad se determinó en un bioensayo basado en células que mide

directamente la capacidad de la trampa de VEGF para inhibir los efectos biológicos del VEGF humano en una línea celular Baf/3 VEGFR1/EpoR de ratón. Por lo tanto, este bioensayo mide directamente la actividad biológica de la proteína. Los resultados se expresan como el porcentaje de potencia relativa (CI_{50} de muestra de ensayo/ patrón de referencia de CI_{50} de VEGF x 100). La afinidad de unión del VEGF a la trampa de VEGF se mide usando un ELISA sensible que mide específicamente el VEGF libre en mezclas en equilibrio que contienen VEGF y diversas concentraciones de la trampa de VEGF. Los resultados se expresan en porcentaje de unión relativa (CI_{50} de la muestra de ensayo/ CI_{50} de referencia x 100). El pH medido oscila entre 6,3 – 6,5. Todas las soluciones fueron visualmente claras. La concentración de trampa de VEGF recuperada se determinó con un espectrofotómetro de UV como mg/ml a A_{280} nm. El porcentaje de trampa de VEGF recuperada en la configuración natural (pureza del pico principal) se determinó con SE-HPLC.

Tabla 8. Estabilidad de Trampa de VEGF Liofilizada Almacenada a 5 °C (VGT-RS475)

Meses	Bioensayo	Ensayo de unión	% Recuperado	% Configuración Natural
0	120	126	97,9	98,7
1	117	74	97,9	98,6
1 + 24 horas	126	72	99,0	98,5
1+ 4 horas	94	81	101,5	98,2
3	101	98	98,1	98,6
3 + 24 horas	65	94	98,1	98,2
6 + 4 horas			96,9	98,7
6 + 24 horas			98,8	98,6

Se ensayó una formulación que contiene aproximadamente fosfato 5 mM, citrato 5 mM, NaCl 100 mM, polisorbato 20 al 0,1 %, sacarosa al 20 % y 25 mg/ml de proteína de trampa de VEGF para la estabilidad y actividad durante 36 meses cuando se almacenó a 5 °C. Los resultados se muestran en la Tabla 9. Todas las muestras fueron claras e incoloras tal como se determinó mediante inspección visual. El pH osciló entre 6,0-6,1. Los resultados del ensayo de unión para dos medidas (1 y 2 meses) se expresan directamente y no como un porcentaje del patrón.

Tabla 9. Estabilidad y Actividad de Formulación Líquida (VGT-FS405)

Meses	% Configuración Natural	Bioensayo	Ensayo de unión	Contenido en proteína mg/ml
0	99,7	106	72	25,0
1	99,9	119	4,4 pM*	25,2
2	99,6	102	5,4 pM*	25,1
3	99,6	97	88	25,1
6	99,6	101	106	25,0
9	99,4	89	126	25,4
12	99,5	85	95	25,2
18	99,4	99	81	25,5
24	99,3	75	95	25,6
36	98,8	109	79	25,6

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
- <120> Formulaciones de antagonistas de VEGF
- <130> 4030A-WO
- <140> A asignar
- <141>22-03-2006

ES 2 633 574 T3

<150> 60/665.125
<151> 25-03-2005

<160> 4

5 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 1453
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Sintética

15 <400> 1

```

aagcttgggc tgcaggctga tgcactctag aggatcgatc cccggggcgag ctogaattcg 60
caaccacccat ggtcagctac tgggacaccg gggctcctgct gtgcgcgcctg ctocagctgtc 120
tgcttctcac aggatctagt tccggaggtg gacctttcgt agagatgtac agtgaaatcc 180
ccgaaattat acacatgact gaaggaaggg agctcgtcat tccctgcogg gttacgtcac 240
ctaacaatcac tgttacttta aaaaagtctc cacttgacac ttgatccct gatggaaaac 300
gcataatctg ggacagtaga aagggttca tcatatcaa tgcaacgtac aaagaaatag 360
ggcttctgac ctgtgaagca acagtcaatg ggcatttgta taagacaaac tatctcacac 420
atcgacaaac caatacaatc atagatgtgg ttctgagtcg gtctcatgga attgaactat 480
ctgttggaga aaagcttgtc ttaaattgta cagcaagaac tgaactaaat gtggggattg 540
acttcaactg ggaataccct tcttcgaagc atcagcataa gaaacttgta aaccgagacc 600
taaaaaccca gtctgggagt gagatgaaga aatttttgag caccttaact atagatgggtg 660
taaccocggag tgaccaagga ttgtacacct gtgcagcatc cagtgggctg atgaccaaga 720
agaacagcac atttgtcagg gtccatgaaa agggcccggg cgacaaaact cacacatgcc 780
caccgtgcc agcacctgaa ctccctggggg gaccgtcagt ctctctcttc ccccaaaaac 840
ccaaggacac cctcatgac tcccggacct ctgaggtcac atgcgtgggtg gtggacgtga 900
gccacgaaga cctgagggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg 960
ccaagacaaa gccgcggggag gagcagtaga acagcacgta ccgtgtggtc agcgtctctc 1020
ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag 1080
ccctoccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac 1140
aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agoctgacct 1200
gcctggtcaa aggtctctat cccagcgaca tgcocgtgga gtgggagagc aatgggcagc 1260
cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgotggactc cgacggctcc ttcttctct 1320
atagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg 1380
tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta 1440
aatgagcggc cgc 1453
    
```

20 <210> 2
<211> 458
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sintética

<400> 2

ES 2 633 574 T3

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
1 5 10 15
Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Gly Arg Pro Phe Val Glu
20 25 30
Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu
35 40 45
Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu
50 55 60
Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile
65 70 75 80
Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu
85 90 95
Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys
100 105 110
Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val
115 120 125
Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val
130 135 140
Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn
145 150 155 160
Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg
165 170 175
Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr
180 185 190
Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys
195 200 205
Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg
210 215 220
Val His Glu Lys Gly Pro Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225 230 235 240
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
245 250 255
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
260 265 270
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
275 280 285
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
290 295 300
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305 310 315 320
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
325 330 335
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
340 345 350
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
355 360 365
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405 410 415
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 3
<211> 1377
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 3

5

```

atggtcagct actgggacac cggggctcctg ctgtgcgggc tgctcagctg tctgcttctc 60
acaggatcta gttccggaag tgataccggg agacctttcg tagagatgta cagtgaatc 120
cccgaatta tacacatgac tgaaggaagg gagctcgtca ttccctgceg ggttacgtca 180
cctaacatca ctgttacttt aaaaaagttt ccacttgaca ctttgatccc tgatggaaaa 240
cgcataatct gggacagtag aaagggcttc atcatatcaa atgcaacgta caaagaaata 300
gggcttctga cctgtgaagc aacagtcaat gggcatttgt ataagacaaa ctatctcaca 360
catcgacaaa ccaatacaat catagatgtg gttctgagtc cgtctcatgg aattgaacta 420
tctgttggag aaaagcttgt cttaaattgt acagcaagaa ctgaactaaa tgtggggatt 480
gacttcaact gggaatatccc ttcttcgaag catcagcata agaaacttgt aaaccgagac 540
ctaaaaaccc agtctgggag tgagatgaag aaatttttga gcaccttaac tatagatggg 600
gtaaccggga gtgaccaagg attgtacacc tgtgcagcat ccagtgggct gatgaccaag 660
aagaacagca catttgtcag ggtccatgaa aaggacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 720
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctctc tccccccaaa acccaaggac 780
accctcatga tctcccgga ccttgaggtc acatgogtgg tgggtggacgt gagccacgaa 840
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtagctg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 900
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 960
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca 1020
gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1080
accctgcccc catccgggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggc 1140
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC 1200
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttctc ctacagcaag 1260
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaaacgtc tctcatgctc cgtgatgcat 1320
gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga 1377
    
```

<210> 4
<211> 458
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Sintética

15

<400> 4

```

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
 1          5          10          15
Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Asp Thr Gly Arg Pro
          20          25          30
Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu
          35          40          45
Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr
          50          55          60
Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys
          65          70          75          80
Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr
          85          90          95
Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His
          100          105          110
Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile
          115          120          125
Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
    
```

ES 2 633 574 T3

130						135						140					
Lys	Leu	Val	Leu	Asn	Cys	Thr	Ala	Arg	Thr	Glu	Leu	Asn	Val	Gly	Ile		
145						150					155						160
Asp	Phe	Asn	Trp	Glu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Lys	His	Gln	His	Lys	Lys	Leu		
				165						170							175
Val	Asn	Arg	Asp	Leu	Lys	Thr	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Met	Lys	Lys	Phe		
			180						185					190			
Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Arg	Ser	Asp	Gln	Gly	Leu		
		195					200						205				
Tyr	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Met	Thr	Lys	Lys	Asn	Ser	Thr		
	210						215						220				
Phe	Val	Arg	Val	His	Glu	Lys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys		
225					230						235						240
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro		
					245						250						255
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys		
			260						265						270		
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp		
			275					280						285			
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu		
	290						295						300				
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu		
305					310								315				320
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn		
				325						330					335		
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly		
			340						345						350		
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu		
		355					360							365			
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr		
	370						375							380			
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn		
385					390						395						400
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe		
			405							410					415		
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn		
			420						425						430		
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr		
		435					440							445			
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
	450						455										

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación farmacéutica líquida estable de un antagonista de proteína de fusión específica de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que comprende una proteína de fusión que consiste en los aminoácidos 27-457 de la SEQ ID NO:4 y los restos de Asn glucosilados en las posiciones 62, 94, 149, 222 y 308, tampón fosfato 5 mM, tampón citrato 5 mM, NaCl 100 mM, polisorbato 20 al 0,1 %, sacarosa al 20 % y 25 mg/ml de la proteína de fusión a un pH de 6,0-6,1.
- 10 2. Una formulación liofilizada, que comprende (i) 5-75 mg/ml de un antagonista de una proteína de fusión específica de un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que consiste en los aminoácidos 27-457 de la SEQ ID NO:4 y restos de Asn glucosilados en las posiciones 62, 94, 149, 222 y 308, (ii) un tampón de histidina que comprende histidina 5-50 mM, (iii) polietilenglicol (PEG) al 0,1-3,0 %, (iv) glicina al 0,25-3,0 % y (v) sacarosa al 0,5-6,0 % a un pH de 6,0-6,5.
- 15 3. La formulación preliofilizada de la reivindicación 2, que comprende histidina 10 mM, PEG 330 al 1,5 %, glicina al 0,75 %, sacarosa al 2,5 % y de 12,5 a 75 mg/ml de la proteína de fusión, a un pH de 6,25.
- 20 4. La formulación preliofilizada de la reivindicación 3, que comprende histidina 10 mM, PEG 3350 al 1,5 %, glicina al 0,75 %, sacarosa al 2,5 % y 50 mg/ml de la proteína de fusión.
- 25 5. Un método para producir una formulación farmacéutica liofilizada de un antagonista de una proteína de fusión específica de VEGF, que comprende someter la formulación preliofilizada de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 a liofilización para generar una formulación farmacéutica liofilizada.
- 30 6. Un método para producir una formulación farmacéutica liofilizada reconstituida de un antagonista de proteína de fusión específica de VEGF, que comprende reconstituir la formulación liofilizada de la reivindicación con líquido, en donde se genera una formulación farmacéutica liofilizada reconstituida.
7. El método de la reivindicación 6, en donde el líquido es agua estéril o agua bacteriostática.