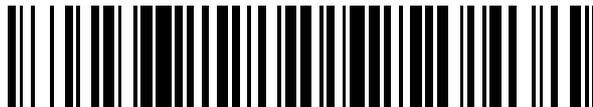


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 254**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00	(2006.01)
A61K 47/22	(2006.01)
A61K 47/24	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61K 9/19	(2006.01)
A61K 47/18	(2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2008 PCT/US2008/078193**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2009 WO09043049**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2008 E 08833819 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 2205280**

54 Título: **Formulaciones farmacéuticas**

30 Prioridad:

27.09.2007 US 975780 P

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

25.03.2020

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**SLOEY, CHRISTOPHER, JAMES;
VERGARA, CAMILLE;
KO, JASON y
LI, TIANSHENG**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 750 254 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 farmacéuticas

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La invención se refiere a disoluciones farmacéuticas líquidas de proteínas que contienen creatina/creatinina o carnitina.

ANTECEDENTES

10 Los anticuerpos farmacéuticamente activos y otras proteínas se formulan frecuentemente en disoluciones líquidas, particularmente para inyección parenteral. La composición farmacéutica se puede vender comercialmente en una forma de disolución lista para uso o se puede proporcionar en una forma liofilizada que se reconstituye con una disolución líquida. Los agentes adicionales se incluyen frecuentemente en la disolución de proteína para minimizar la degradación, precipitación y/o agregación de la proteína. Las formulaciones de proteína altamente concentradas son deseables cuando se requiere la administración de una proteína terapéutica en pequeñas cantidades de volumen, por ejemplo durante la inyección subcutánea. Sin embargo, las disoluciones de proteína altamente concentradas frecuentemente presentan elevada viscosidad. Existe una necesidad de desarrollar métodos de reducción de la viscosidad de una formulación que contenga altas concentraciones de proteína, y una necesidad de formulaciones de viscosidad reducida resultantes.

15 La creatina (también conocida como N-amidinósarcosina o ácido (alfa-metilguanido)acético) es un compuesto que existe de forma natural que es usado por los vertebrados con el fin de almacenamiento de energía en células de músculo. Se produce por el hígado y los riñones y está presente en carne y pescado en altas cantidades. Está presente en bajas cantidades en sangre y se convierte en disoluciones acuosas en creatinina en una reacción reversible. La relación de equilibrio entre la creatina y la creatinina (2-amino-1-metil-2-imidazolin-4-ona) depende del pH de la disolución y se desplazará hacia la formación de creatinina a bajo pH.

20 La carnitina (también conocida como beta-hidroxi-gamma-(trimetilamonio)butirato) es un co-factor metabólico que es esencial para el metabolismo de los ácidos grasos en seres humanos y otros organismos. Está presente en altas cantidades en carnes y productos lácteos y en menores cantidades en frutos secos, semillas, verduras, frutas y cereales.

25 El documento de patente WO2007/057748 desvela composiciones líquidas orales que comprenden una alta cantidad de proteína (tal como calostro) y excipientes tales como creatina y creatinina.

30 El documento de patente WO 90/00397 desvela las composiciones de disolución parenteral que comprenden proteínas (tales como IL-2) con carnitina como excipiente. Se liofilizan las disoluciones y se reconstituye el polvo.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

35 La presente invención proporciona el uso de un excipiente seleccionado del grupo que consiste en creatina, creatinina, carnitina, y mezclas de las mismas, para reducir la viscosidad de una disolución farmacéutica líquida acuosa adecuada para administración parenteral, comprendiendo dicha disolución una proteína terapéutica a una concentración de al menos 70 mg/mL. También se proporciona por la invención una disolución farmacéutica líquida adecuada para administración parenteral que comprende una proteína terapéutica a una concentración de al menos 70 mg/mL, y un excipiente seleccionado del grupo que consiste en creatina, creatinina, carnitina, y mezclas de las mismas. Las disoluciones farmacéuticas líquidas de la invención presentan propiedades ventajosas de viscosidad reducida a altas concentraciones de proteína superiores a 70 mg/mL, o superiores a 100 mg/mL. También pueden mostrar agregación reducida. Las disoluciones de la presente invención pueden ser estériles y en una forma adecuada para administración parenteral, por ejemplo administración intravenosa o subcutánea. Los métodos de la invención usan un excipiente seleccionado del grupo que consiste en creatinina, creatina o carnitina, o mezclas de las mismas, para reducir la viscosidad de una formulación farmacéutica de una proteína terapéutica. Los métodos implican combinar cantidades reductoras de la viscosidad de un excipiente seleccionado del grupo que consiste en creatinina, creatina o carnitina, o mezclas de las mismas, con la proteína terapéutica en una disolución acuosa. Se contemplan una variedad de proteínas terapéuticas para su uso en los métodos y disoluciones farmacéuticas líquidas de la invención, que incluyen anticuerpos y otras proteínas no de anticuerpo.

45 En un aspecto, por tanto, la presente invención proporciona el uso de un excipiente seleccionado del grupo que consiste en creatina, creatinina, carnitina, y mezclas de las mismas, para reducir la viscosidad de una disolución farmacéutica líquida acuosa adecuada para administración parenteral, comprendiendo dicha disolución una proteína terapéutica a una concentración de al menos 70 mg/mL. La proteína terapéutica está a una concentración de al menos aproximadamente 70 mg/mL, o al menos aproximadamente 100 mg/mL. En algunas realizaciones, la reducción en la viscosidad es al menos 10 %, 20 % o 30 % en comparación con controles sin excipiente.

55 En otro aspecto más, la presente invención proporciona además una disolución farmacéutica líquida adecuada para administración parenteral que comprende una proteína terapéutica a una concentración de al menos 70 mg/mL, y un

excipiente seleccionado del grupo que consiste en creatina, creatinina, carnitina, y mezclas de las mismas. Las disoluciones farmacéuticas líquidas presentan viscosidad reducida o estabilidad mejorada con respecto a los controles sin excipiente. El excipiente está presente a una concentración reductora de la viscosidad (peso:volumen); el excipiente también puede estar presente a una concentración reductora de la agregación. En algunas realizaciones, la concentración de creatina/creatinina es 0,002 mM a 750 mM, o 0,01 a 50 mM. En otras realizaciones, la concentración de carnitina es 1 mM a 3 M, o 5 a 300 mM.

En algunas realizaciones, el pH de la composición es entre 4 y 6, o 5,0-5,5.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de preparación de un polvo liofilizado que comprende la etapa de liofilizar cualquiera de las disoluciones farmacéuticas descritas en el presente documento. En un aspecto relacionado, la invención proporciona un polvo liofilizado obtenible por el método de preparación de un polvo liofilizado de la invención, que comprende un anticuerpo terapéutico y un excipiente seleccionado del grupo que consiste en creatina, creatinina, carnitina y mezclas de las mismas, en donde, tras la reconstitución con un diluyente acuoso, la disolución resultante presenta viscosidad reducida con respecto a un control sin excipiente y en donde dicha disolución acuosa reconstituida es adecuada para administración parenteral. El excipiente está presente a una concentración reductora de la viscosidad (peso:peso). En realizaciones a modo de ejemplo, la concentración de creatina/creatinina es aproximadamente 4 ng por mg de proteína terapéutica a aproximadamente 1,25 mg por mg de proteína terapéutica. En otras realizaciones a modo de ejemplo, la concentración de carnitina es aproximadamente 2 µg a aproximadamente 7 mg por mg de proteína terapéutica. En otros aspectos relacionados, la invención proporciona un método de reconstitución de un polvo liofilizado que comprende la etapa de añadir un diluyente acuoso estéril a dicho polvo, en donde dicho polvo liofilizado comprende una proteína terapéutica y un excipiente seleccionado del grupo que consiste en creatina, creatinina, carnitina, y mezclas de las mismas, y en donde dicho método produce una disolución farmacéutica líquida acuosa que comprende la proteína terapéutica a una concentración superior a 70 mg/mL, siendo dicha disolución farmacéutica líquida acuosa adecuada para administración parenteral.

También se refiere a las formulaciones líquidas o reconstituidas descritas en el presente documento para la administración a un ser humano. La invención proporciona las disoluciones farmacéuticas líquidas de la invención para su uso en un método para el tratamiento, profiláctico o terapéutico, de un trastorno tratable por la proteína terapéutica (por ejemplo, anticuerpo), en donde la disolución se administra por vía parenteral. Dichas disoluciones farmacéuticas líquidas son particularmente útiles para administración subcutánea donde se desean pequeños volúmenes, por ejemplo, 1 o 1,5 mL.

También se desvela un kit que comprende una disolución de proteína farmacéutica líquida de la invención, e instrucciones para su administración, opcionalmente con una jeringa u otro dispositivo de administración. También se desvela un kit que comprende un polvo liofilizado de la invención e instrucciones para su reconstitución y administración, opcionalmente con un vial de diluyente estéril, y opcionalmente con una jeringa u otro dispositivo de administración. Los kits no forman parte de las reivindicaciones.

También se desvela, pero no está presente en las reivindicaciones, un método de cribado de una concentración reductora de la viscosidad de excipiente seleccionado del grupo que consiste en creatinina, creatina o carnitina, o mezclas de las mismas, que comprende las etapas de: (1) evaluar la viscosidad de una primera disolución que comprende una primera concentración de excipiente(s) y una proteína terapéutica, tal como un anticuerpo, (2) evaluar la viscosidad de una segunda disolución que comprende una segunda concentración diferente de excipiente(s) y la proteína terapéutica, y (3) determinar que la primera concentración de excipiente(s) es más reductora de la viscosidad que la segunda concentración de excipiente(s) si la primera disolución es menos viscosa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. La preparación de formulaciones usando concentraciones en equilibrio de creatina/creatinina da como resultado concentraciones de excipiente estables durante la estabilidad en almacén de la formulación de anticuerpo.

Figura 2. El efecto de la creatina 50 mM y creatinina 50 mM sobre la viscosidad del Anticuerpo A. La creatina y la creatinina provocan ambas una disminución significativa en la viscosidad de una formulación que contiene 235 mg/mL de Anticuerpo A en acetato sódico 10 mM a pH 5,20. En equilibrio, la disminución en la viscosidad de la formulación es constante si empieza con creatina 50 mM o creatinina 50 mM.

Figura 3. Concentraciones crecientes de creatinina conducen a una disminución adicional en la viscosidad de una formulación que contiene 236 mg/mL de Anticuerpo A en acetato sódico 10 mM a pH 5,20. A creatinina 275 mM a pH 5,20, habrá creatinina 225 mM y creatina 50 mM en equilibrio. A esa concentración, la formulación es aproximadamente 75 % menos viscosa que la formulación de control.

Figura 4. Efecto de concentraciones variables de creatinina/creatinina sobre la viscosidad de una formulación que contiene 200 mg/mL de Anticuerpo A.

Figura 5. Efecto de concentraciones variables de creatinina/creatinina sobre la viscosidad de una formulación que contiene 300 mg/mL de Anticuerpo A.

Figura 6. La carnitina disminuye la viscosidad de una formulación de 215 mg/mL de Anticuerpo A en acetato sódico 10 mM a pH 5,0.

Figura 7. El efecto de la creatina sobre la agregación térmicamente inducida de Anticuerpo A. Se probó una concentración de creatinina 55 mM para su capacidad para reducir la agregación térmicamente inducida cuando la formulación se mantuvo a 52 °C.

Figura 8. El efecto de las combinaciones de creatina-poliol sobre la agregación térmicamente inducida de Anticuerpo A.

Figura 9. El efecto de la concentración de creatina sobre la reducción de la agregación térmicamente inducida de un anticuerpo IgG2 anti-estreptavidina, a una concentración de 30 mg/mL, a 52 °C durante una semana.

Figura 10. El efecto de la concentración de L-carnitina sobre la reducción de la agregación térmicamente inducida de Anticuerpo A, a una concentración de 100 mg/mL, a 52 °C durante cuatro días.

Figura 11. El efecto de una formulación tamponada de L-carnitina sobre la agregación térmicamente inducida de otro anticuerpo IgG2, a una concentración de 7 mg/mL, a 52 °C durante cuatro semanas.

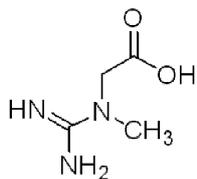
Figura 12. El efecto de creatinina sobre la viscosidad de una formulación de anticuerpo IgG2 humanizado a una concentración de 160 mg/mL de acetato sódico 10 mM a pH 5,20. "A52Su Control" es acetato sódico a pH 5,20 que contiene 9 % de sacarosa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

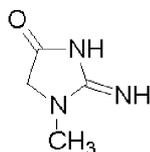
I. Definiciones

A. General

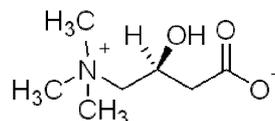
Las estructuras de creatina, creatinina y carnitina se exponen a continuación:



Creatina



Creatinina



Carnitina

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio e incluye anticuerpos completamente ensamblados, anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos que se pueden unir a antígeno (por ejemplo, Fab', F'(ab)2, Fv, anticuerpos monocatenarios, diacuerpos), que comprenden regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de los anteriores, en tanto que presenten la actividad biológica deseada. Se contemplan multímeros o agregados de moléculas intactas y/o fragmentos, que incluyen anticuerpos químicamente derivatizados. Se contemplan anticuerpos de cualquier clase o subclase de isotipo, que incluyen IgG, IgM, IgD, IgA, e IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, o cualquier alotipo. Los diferentes isotipos tienen diferentes funciones efectoras; por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 tienen actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Un anticuerpo que "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido particular es uno que se une a ese polipéptido o epítipo particular en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a otros epítipos relacionados de polipéptidos o polipéptido.

El término "carnitina", como se usa en el presente documento, incluye una cualquiera de L-carnitina y/o acetil-L-carnitina; D-carnitina y/o acetil-D-carnitina; o mezclas de cualquiera de las anteriores tales como mezclas racémicas.

Como se usa en el presente documento, se entenderá que "concentración de creatina/creatinina" es la concentración de creatina y creatinina añadidas juntas. La creatina experimenta naturalmente una reacción reversible de ciclación/deshidratación para formar creatinina (véase, por ejemplo, M. Wyss & R. Kaddurah-Daouk, *Physiol. Rev.*, vol. 80, no. 3, pp. 1107-1213, 2000). Esta reacción es espontánea y no requiere la presencia de una enzima o catalizador. Las condiciones de pH alto favorecen la creatina, mientras que condiciones de pH bajo favorecen la creatinina. Así, el término "concentración de creatina/creatinina" se refiere a las concentraciones de creatina y creatinina que estarían naturalmente presentes bajo cualquier condición particular (por ejemplo, pH, temperatura) si la concentración citada de cualquier creatina sola, creatinina sola, o una mezcla de ambas, se fuera

a añadir inicialmente a la disolución. Por ejemplo, se consideraría que una concentración de creatina 50 mM y creatinina 50 mM es concentración 100 mM de creatina/creatinina.

La creatina y la creatinina se pueden separar, identificar y cuantificar usando una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método de cromatografía de fase inversa (RP-HPLC) puede implicar elución isocrática de los compuestos en una fase móvil que contiene sulfato de amonio 0,045 M de una columna de fase inversa C18, seguido por detección de los compuestos a 205 nM usando un detector de UV. La integración de los picos respectivos permite la cuantificación relativa de creatina y creatinina, así como la cuantificación absoluta usando una curva patrón de cantidades inyectadas conocidas. Se pueden confirmar las identidades de picos de creatina y creatinina dudosos con detección directa de espectrometría de masas (CL-EM). Alternativamente, se pueden recoger fracciones correspondientes a los picos dudosos y analizar adicionalmente por espectrometría de masas, espectroscopía vibracional, u otras pruebas químicas, para la identificación de creatina y creatinina. Se espera que la cuantificación usando RP-HPLC/CL-EM, por ejemplo, sea mejor que otros métodos tales como espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) o Raman.

Como se usa en el presente documento, la "formulación farmacéutica" es una composición estéril de un fármaco farmacéuticamente activo, tal como una proteína biológicamente activa, que es adecuada para administración parenteral (que incluye, pero no se limita a, intravenosa, intramuscular, subcutánea, aerosolizada, intrapulmonar, intranasal o intratecal) a un paciente en necesidad de la misma e incluye solo excipientes, diluyentes farmacéuticamente aceptables, y otros aditivos considerados seguros por la Agencia Federal de Fármacos u otras autoridades nacionales extranjeras. Las formulaciones farmacéuticas incluyen líquido, por ejemplo disoluciones acuosas, que se pueden administrar directamente, y polvos liofilizados que se pueden reconstituir en disoluciones añadiendo un diluyente antes de la administración. Se excluyen específicamente del alcance del término "formulación farmacéutica" las composiciones para administración tópica a pacientes, composiciones para ingestión oral, y composiciones para alimentación parenteral.

Como se usa en el presente documento, "estabilidad en almacén" significa el periodo de almacenamiento durante el que un principio activo, tal como una proteína terapéutica, en una formulación farmacéutica tiene degradación mínima (por ejemplo, no superior a aproximadamente 2-3 % de degradación) cuando la formulación farmacéutica se almacena en condiciones especificadas de almacenamiento, por ejemplo, 2-8 °C. Las técnicas para evaluar la degradación varían dependiendo de la identidad de la proteína en la formulación farmacéutica. Las técnicas a modo de ejemplo incluyen cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)-HPLC para detectar, por ejemplo, agregación, (RP)-HPLC de fase inversa para detectar, por ejemplo, la fragmentación de proteínas, intercambio iónico-HPLC para detectar, por ejemplo, cambios en la carga de proteína, espectrometría de masas, espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía por dicroísmo circular (CD), espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) y espectroscopía Raman para detectar cambios conformacionales de proteína. Todas estas técnicas se pueden usar individualmente o en combinación para evaluar la degradación de la proteína en la formulación farmacéutica y determinar la estabilidad en almacén de esa formulación. Las disoluciones farmacéuticas líquidas de la presente invención presentan preferentemente degradación (por ejemplo, fragmentación, agregación o desplegamiento) de no más de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 % durante dos años cuando se almacenan a 2-8 °C.

Como se usa en el presente documento, "formulaciones estables" de proteínas biológicamente activas son formulaciones que presentan agregación reducida y/o pérdida reducida de actividad biológica de al menos 5 % tras el almacenamiento a 2-8 grados centígrados durante al menos 2 años en comparación con una muestra de control, o alternativamente que presentan agregación reducida y/o pérdida reducida de actividad biológica en condiciones de estrés térmico, por ejemplo 52 grados centígrados durante 7-8 días.

Como se usa en el presente documento, la "viscosidad" es una resistencia del fluido a fluir, y se puede medir en unidades de centipoise (cP) o miliPascal-segundo (mPa-s), donde 1 cP=1 mPa-s, a una velocidad de cizallamiento dada. La viscosidad se puede medir usando un viscosímetro, por ejemplo, el viscosímetro Brookfield Engineering Dial Reading, modelo LVT. La viscosidad se puede medir usando cualquier otro método y en cualquier otra unidad conocida en la técnica (por ejemplo, viscosidad absoluta, cinemática o dinámica), entendiéndose que es importante el porcentaje de reducción en la viscosidad proporcionado por el uso de los excipientes descritos por la invención. Independientemente del método usado para determinar la viscosidad, el porcentaje de reducción en la viscosidad en el excipiente frente al control seguirá siendo aproximadamente el mismo a una velocidad de cizallamiento dada.

Como se usa en el presente documento, una formulación que contiene una cantidad de excipiente eficaz para "reducir la viscosidad" (o una cantidad o concentración "reductora de la viscosidad" de dicho excipiente) significa que la viscosidad de la formulación en su forma final para administración (si es una disolución, o si es un polvo, tras la reconstitución con la cantidad prevista de diluyente) es al menos 5 % inferior a la viscosidad de una formulación de control que carece de dicho excipiente ("sin excipiente"). Similarmente, una formulación de "viscosidad reducida" es una formulación que presenta viscosidad reducida en comparación con una formulación sin excipiente.

Proteínas terapéuticas

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento, y se refieren a un polipéptido que tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 4 kilodáltones (kD). Los polipéptidos a modo

de ejemplo pueden tener un peso molecular de al menos aproximadamente 4 kD, 8 kD, 15 kD, 20 kD, 25 kD, 30 kD, 40 kD o 50 kD.

La invención desvelada en el presente documento se puede poner en práctica con una variedad de proteínas terapéuticas como se describe en el presente documento. Entre las proteínas a modo de ejemplo, a este respecto están las proteínas farmacéuticas para uso terapéutico veterinario y/o humano, particularmente las proteínas para uso terapéutico humano. También están entre las proteínas a modo de ejemplo las proteínas que son solubles en disoluciones acuosas, particularmente las que son solubles a concentraciones relativamente altas y las que son estables durante largos periodos de tiempo.

Entre la variedad de proteínas farmacéuticamente activas contempladas para su uso en las disoluciones farmacéuticas líquidas y los métodos de la invención están los anticuerpos, pepticuerpos, proteínas de tipo inmunoglobulina, proteínas no de anticuerpo, proteínas de tipo no inmunoglobulina, proteínas de fusión tales como pepticuerpos, proteínas de fusión de Fc, avímeros, proteínas quiméricas, y/ o proteínas multi-catenarias, tanto si existen de forma natural como si no existen de forma natural. Los ejemplos no limitantes incluyen proteínas estructurales, enzimas, hormonas, factores hematopoyéticos, factores de crecimiento, citocinas, quimioquinas, factores antiobesidad, factores tróficos, factores antiinflamatorios y proteínas reguladoras, que incluyen, pero no se limitan a, factor de células madre, leptina, insulina, gastrina, prolactina, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona estimulante tiroidea (TSH), hormona luteinizante (LH), hormona foliculoestimulante (FSH), gonadotropina coriónica humana (HCG), motilina, interferón (alfa, beta, gamma), interleucina (IL-1 a IL-12), factor de necrosis tumoral (TNF), proteína de unión a factor de necrosis tumoral (TNF-bp), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), factor neurotrófico 3 (NT3), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor neurotrófico de crecimiento (NGF), factor de crecimiento óseo tal como osteoprotegerina (OPG), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento derivado de megacariocitos (MGDF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), trombopoyetina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PGDF), factor de crecimiento estimulante de colonias (CSF), proteína morfogenética ósea (BMP), superóxido dismutasa (SOD), activador tisular del plasminógeno (TPA), urocinasa, estreptocinasa, o calicreína. Los análogos de proteínas que existen de forma natural se contemplan para su uso en disoluciones farmacéuticas líquidas y métodos de la presente invención, que incluyen polipéptidos con glucosilación modificada, o polipéptidos sin glucosilación (sin glucosilar), y polipéptidos con otras modificaciones post-traduccionales que se pueden preparar por sistemas de modificación celular o mediante métodos enzimáticos y/o químicos.

En algunas realizaciones, la proteína terapéutica es una proteína estimulante de la eritropoyesis. Como se usa en el presente documento, "proteína estimulante de la eritropoyesis" significa una proteína que provoca directa o indirectamente la activación del receptor de eritropoyetina, por ejemplo, uniendo a y causando la dimerización del receptor. Las proteínas estimulantes de la eritropoyesis incluyen eritropoyetina y variantes, análogos, o derivados de la misma, que se unen a y activan el receptor de eritropoyetina; los anticuerpos que se unen al receptor de eritropoyetina y activan el receptor; o los péptidos que se unen a y activan el receptor de eritropoyetina. Las proteínas estimulantes de la eritropoyesis incluyen, pero no se limitan a, epoetina alfa, epoetina beta, epoetina delta, epoetina omega, epoetina iota, epoetina zeta, y sus análogos, eritropoyetina pegilada, eritropoyetina carbamilada, peptidomiméticos (incluyendo EMP1/Hematide), y miméticos de anticuerpos. Las proteínas estimulantes de la eritropoyesis a modo de ejemplo incluyen eritropoyetina, darbepoetina, variantes de los agonistas de la eritropoyetina, y péptidos o anticuerpos que se unen y activan el receptor de eritropoyetina (e incluyen los compuestos informados en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. N° 2003/0215444 y 2006/0040858), así como moléculas de eritropoyetina o variantes o análogos de la misma, como se desvela en las siguientes patentes o solicitudes de patente: las patentes de EE.UU. N° 4.703.008; 5.441.868; 5.547.933; 5.618.698; 5.621.080; 5.756.349; 5.767.078; 5.773.569; 5.955.422; 5.830.851; 5.856.298; 5.986.047; 6.030.086; 6.310.078; 6.391.633; 6.583.272; 6.586.398; 6.900.292; 6.750.369; 7.030.226; 7.084.245; 7.217.689; publicaciones PCT N° WO 91/05867; WO 95/05465; WO 99/66054; WO 00/24893; WO 01/81405; WO 00/61637; WO 01/36489; WO 02/014356; WO 02/19963; WO 02/20034; WO 02/49673; WO 02/085940; WO 03/029291; WO 2003/055526; WO 2003/084477; WO 2003/094858; WO 2004/002417; WO 2004/002424; WO 2004/009627; WO 2004/024761; WO 2004/033651; WO 2004/035603; WO 2004/043382; WO 2004/101600; WO 2004/101606; WO 2004/101611; WO 2004/106373; WO 2004/018667; WO 2005/001025; WO 2005/001136; WO 2005/021579; WO 2005/025606; WO 2005/032460; WO 2005/051327; WO 2005/063808; WO 2005/063809; WO 2005/070451; WO 2005/081687; WO 2005/084711; WO 2005/103076; WO 2005/100403; WO 2005/092369; WO 2006/50959; WO 2006/02646; WO 2006/29094; y publicaciones de EE.UU. N° US 2002/0155998; US 2003/0077753; US 2003/0082749; US 2003/0143202; US 2004/0009902; US 2004/0071694; US 2004/0091961; US 2004/0143857; US 2004/0157293; US 2004/0175379; US 2004/0175824; US 2004/0229318; US 2004/0248815; US 2004/0266690; US 2005/0019914; US 2005/0026834; US 2005/0096461; US 2005/0107297; US 2005/0107591; US 2005/0124045; US 2005/0124564; US 2005/0137329; US 2005/0142642; US 2005/0143292; US 2005/0153879; US 2005/0158822; US 2005/0158832; US 2005/0170457; US 2005/0181359; US 2005/0181482; US 2005/0192211; US 2005/0202538; US 2005/0227289; US 2005/0244409; US 2006/0088906; US 2006/0111279.

Como se usa en el presente documento, el término "análogos", cuando se usa con referencia a polipéptidos, se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene inserciones, deleciones o sustituciones con respecto a la secuencia parental, mientras mantiene todavía sustancialmente la actividad biológica de la secuencia parental,

como se determina usando ensayos biológicos conocidos para un experto en la técnica. Las formulaciones y métodos de la divulgación también pueden incluir "derivados" de polipéptidos que existen de forma natural o análogos que han sido químicamente modificados, por ejemplo, para unir polímeros solubles en agua (por ejemplo, pegilados), marcas (por ejemplo, radionúclidos o diversas enzimas), u otros restos de diagnóstico o de direccionamiento, o terapéuticos, o por inserción o sustitución de aminoácidos no naturales por medios químicos. Dichos derivados retendrán las propiedades de unión de moléculas no derivatizadas.

Dichos polipéptidos se pueden derivar de una fuente natural, construida por síntesis química de novo, o semi-síntesis, o expresar recombinantemente, por ejemplo, por expresión de una construcción de expresión exógena, por activación de un gen endógeno (por recombinación homóloga o no homóloga, por ejemplo), por expresión de un gen exógeno bajo el control de una región de control de la transcripción endógena, o cualquier otra técnicas conocida en la técnica.

Adicionalmente, entre las proteínas a modo de ejemplo para su uso en las composiciones y métodos de la invención están las proteínas para disoluciones farmacéuticas líquidas que no inducen una respuesta antigénica altamente perjudicial tras la administración a un sujeto. A modo de ejemplo, a este respecto están las proteínas para uso médico veterinario y/o humano, particularmente, con respecto a las últimas, proteínas humanizadas y humanas.

Adicionalmente, entre las proteínas a modo de ejemplo son las proteínas que se unen selectivamente a dianas específicas, que incluyen proteínas de unión a ligando y ligandos de proteína. Las proteínas de unión al antígeno, proteínas derivadas de las mismas, y proteínas relacionadas con las mismas, están entre las realizaciones particularmente a modo de ejemplo a este respecto.

Anticuerpos

Entre las proteínas particularmente a modo de ejemplo que se pueden usar en las composiciones y métodos de la presente invención están los polipéptidos de anticuerpo. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye cadenas pesadas o ligeras, anticuerpos completamente ensamblados, anticuerpos monoclonales pesados (que incluyen anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), fragmentos de anticuerpos que se pueden unir a antígeno (por ejemplo, Fab', F'(ab)₂, Fv, anticuerpos monocatenarios, diacuerpos), y polipéptidos que comprenden 1, 2, 3, 4, 5 o todas las 6 regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de los anteriores, y proteínas de fusión o variantes o derivados de las mismas, en tanto que presenten la actividad de unión o biológica deseada. Los anticuerpos de cualquier clase o subclase de isotipo, que incluyen IgG, IgM, IgD, IgA, e IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, o cualquier alotipo, se pueden usar en las composiciones o métodos de la presente invención. Los anticuerpos se pueden preparar por cualquier técnica conocida en la técnica, que incluye tecnologías de hibridoma, por activación de un gen endógeno (por recombinación homóloga o no homóloga, por ejemplo), por expresión de un gen exógeno bajo el control de una región de control de la transcripción endógena, por expresión de una construcción de expresión exógena, por semi-síntesis y por síntesis de novo.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que existen de forma natural o modificaciones post-traduccionales alternativas que pueden estar presentes en cantidades menores, si se producen a partir de hibridomas o técnicas de ADN recombinante. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos murinos, quiméricos, humanizados o humanos, o variantes o derivados de los mismos. La humanización o modificación de la secuencia de anticuerpos para ser más de tipo humano se describe en, por ejemplo, Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 81:6851-6855 (1984); Morrison y Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeyer et al., *Science* 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.* 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immunol.* 31(3):169-217 (1994); y Kettleborough, C.A. et al., *Protein Eng.* 4(7):773-83 (1991); Co, M. S., et al. (1994), *J. Immunol.* 152, 2968-2976; Studnicka et al. *Protein Engineering* 7: 805-814 (1994). Un método de aislamiento de anticuerpos monoclonales humanos es el uso de tecnología de presentación en fagos. La presentación en fagos se describe en, por ejemplo, Dower et al., documento de patente WO 91/17271, McCafferty et al., documento de patente WO 92/01047, y Caton y Koprowski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6450-6454 (1990). Otro método de aislamiento de anticuerpos monoclonales humanos usa animales transgénicos que no tienen producción de inmunoglobulina endógena y se manipulan para contener loci de inmunoglobulina humana. Véanse, por ejemplo, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); documentos de patente WO 91/10741, WO 96/34096, WO 98/24893, o publicación de solicitudes de patente de EE.UU. N° 20030194404, 20030031667 o 20020199213.

Los fragmentos de anticuerpos se pueden producir por técnicas de ADN recombinante o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa intacto, preferentemente la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto, e incluyen anticuerpos multispecíficos (biespecíficos, triespecíficos, etc.) formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Los ejemplos no limitantes de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv (región variable), anticuerpos de dominio (dAb, que contiene un dominio VH; Ward et al., *Nature* 341:544-546, 1989), fragmentos de la región

determinante de la complementariedad (CDR), anticuerpos monocatenarios (scFv, que contiene dominios VH y VL en una única cadena de polipéptidos; Bird et al., Science 242:423-426, 1988, y Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988, que incluyen opcionalmente un conector polipeptídico; y opcionalmente multiespecífico, Gruber et al., J. Immunol. 152: 5368 (1994)), fragmentos monocatenarios de anticuerpos, diacuerpos (dominios VH y VL en una única cadena de polipéptidos que se emparejan con dominios VL y VH complementarios de otra cadena; documentos de patente EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)), triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos (scFv fusionado con CH3 mediante un conector peptídico (sin bisagra) o mediante una bisagra de IgG; Olafsen, et al., Protein Eng Des Sel. 2004 Apr;17(4):315-23), anticuerpos lineales (segmentos de Fd en tándem (VH -CH1-VH-CH1; Zapata et al., Protein Eng.,8(10):1057-1062 (1995)); anticuerpos recombinantes quelantes (crAb, que pueden unirse a dos epítopes adyacentes en el mismo antígeno; Neri et al., J Mol Biol. 246:367-73, 1995), bicuerpos (Fab-scFv biespecíficos) o tricuerpos (Fab-(scFv)(2) triespecífico; Schoonjans et al., J Immunol. 165:7050-57, 2000; Willems et al., J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 786:161-76, 2003), intracuerpos (Biocca, et al., EMBO J. 9:101-108, 1990; Colby et al., Proc Natl Acad Sci USA. 101:17616-21, 2004) que también pueden comprender secuencias señal de células que retienen el anticuerpo intracelularmente (Mhashilkar et al, EMBO J 14:1542-51, 1995; Wheeler et al., FASEB J. 17:1733-5, 2003), transcuerpos (anticuerpos permeables a células que contienen un dominio de transducción de proteínas (PTD) condensado con scFv; Heng et al., Med Hypotheses. 64:1105-8, 2005), nanocuerpos (dominio variable de aproximadamente 15 kDa de la cadena pesada; Cortez-Retamozo et al., Cancer Research 64:2853-57, 2004, productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIPs; documento de patente WO 03/041600, publicación de patente de EE.UU. 2003/0133939 y publicación de patente de EE.UU.2003/0118592), una proteína de fusión de dominio de unión al antígeno-inmunoglobulina, un anticuerpo camelizado (en el que VH se recombina con una región constante que contiene los dominios bisagra, CH1, CH2 y CH3; Desmyter et al., J. Biol. Chem. 276:26285-90, 2001; Ewert et al., Biochemistry 41:3628-36, 2002; publicaciones de patente de EE.UU. N° 20050136049 y 20050037421), un VHH que contiene anticuerpo, anticuerpos de cadena pesada (HCAs, homodímeros de dos cadenas pesadas que tienen la estructura H2L2), o variantes o derivados de los mismos, y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión de antígeno específica al polipéptido, tal como una secuencia de CDR, en tanto que el anticuerpo retenga la actividad biológica deseada.

El término región "hipervariable" o "región determinante de la complementariedad" (CDR) se refiere a los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada como se describe por Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); o una definición alternativa de residuos de CDR de un "bucle" hipervariable se describe por Chotia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987) como los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada). Los residuos de la "región estructural" son los residuos de la región variable distintos de los residuos de la región hipervariable.

El término "variante", cuando se usa a propósito de los anticuerpos, se refiere a la secuencia de polipéptidos de un anticuerpo que contiene al menos una sustitución, delección o inserción de aminoácidos en la región variable o la porción equivalente a la región variable, a condición de que la variante retenga la afinidad de unión o actividad biológica deseada. Además, los anticuerpos para su uso en la invención pueden tener modificaciones de aminoácidos en la región constante para modificar la función efectora del anticuerpo, que incluye semivida o eliminación, actividad de ADCC y/o CDC. Dichas modificaciones puede potenciar la farmacocinética o potenciar la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer, por ejemplo. Véase Shields et al., J. Biol. Chem., 276(9):6591-6604 (2001).

El término "derivado", cuando se usa a propósito de los anticuerpos, se refiere a anticuerpos covalentemente modificados por conjugación con agentes terapéuticos o de diagnóstico, marcado (por ejemplo, con radionúclidos o diversas enzimas), unión de polímero covalente tal como pegilación (derivatización con polietilenglicol) e inserción o sustitución por síntesis química de aminoácidos no naturales. Los derivados para su uso en la invención retendrán las propiedades de unión de moléculas no derivatizadas para su uso en la invención. La conjugación de anticuerpos que se dirigen al cáncer con agente citotóxico, por ejemplo, isótopos radiactivos (por ejemplo, I131, I125, Y90 y Re186), agentes quimioterapéuticos, o toxinas, puede potenciar la destrucción de las células cancerosas.

Se conocen en la técnica los métodos de preparación de anticuerpos biespecíficos u otros multiespecíficos e incluyen reticulación química, uso de cremalleras de leucina (Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553, 1992)]; tecnología de diacuerpos (Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48, 1993); dímeros scFv (Gruber et al., J. Immunol. 152: 5368, 1994), anticuerpos lineales (Zapata et al., Protein Eng. 8:1057-62, 1995); y anticuerpos recombinantes quelantes (Neri et al., J Mol Biol. 246:367-73, 1995).

Proteínas de unión diana

También entre las proteínas a modo de ejemplo para su uso en la invención a este respecto están otros tipos de proteínas de unión diana, y proteínas que se relacionan con las mismas o derivadas de las mismas, y ligandos de proteína, y proteínas derivadas de las mismas o relacionadas con las mismas, particularmente las que comprenden una región Fc de un anticuerpo o una variante o derivado de una región Fc. Entre las proteínas de unión a ligando a

modo de ejemplo, a este respecto están las proteínas que se unen a proteínas de señal y efectoras, y proteínas relacionadas con las mismas o derivadas de las mismas.

Los peptidocuerpos, moléculas que comprenden un dominio Fc de anticuerpo unidas a al menos un péptido de unión al antígeno, se describen generalmente en la publicación PCT WO 00/24782, publicada el 4 de mayo de 2000. Las proteínas de tipo inmunoglobulina, miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, contienen uno o más dominios de tipo inmunoglobulina que se pliegan en estructuras similares a las porciones de la región variable del anticuerpo.

También se contemplan con respecto a las composiciones y métodos de la invención las disoluciones farmacéuticas líquidas que contienen armazones de proteína que pueden comprender una única cadena de proteína o un complejo multi-polipéptido. Los armazones de proteína a modo de ejemplo son avímeros, que son multímeros de avidez que contienen una única cadena de proteína constituida de múltiples dominios, cada uno de los cuales representa una función separada (Silverman et al., *Nat Biotech* 23(12): 1556-1561 (2005); publicación de patente de EE.UU. N° US 2005/0089932 A1). Otros armazones de proteína se revisan en Razeghifard et al., *Current Protein & Peptide Science*. 8(1):3-18, 2007. Otros armazones de proteína adecuados para presentar péptidos se revisan en Hosse et al., *Protein Science* 15:14-27, 2006 (que revisa armazones tales como el dominio de fibronectina tipo III, una lipocalina, una knotina, citocromo b562, un inhibidor de la proteasa de tipo kunitz, el dominio Z y el módulo de unión de hidrato de carbono CBM4-2). Véase también Gill et al., *Current Opin. Biotechnol.*, 17:653-658 (2006) (anticuerpos de un solo dominio, productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños, tetranectinas, adnectinas, proteínas de dominio A, lipocalinas, proteínas de repetición de ankilina), y Skerra, *J. Mol. Recognit.*, 13:167-187 (2000) (dominios individuales de anticuerpos o de la superfamilia de la inmunoglobulina, inhibidores de la proteasa, proteínas del haz de hélices, péptidos unidos por disulfuro y lipocalinas).

Las proteínas de unión diana, que incluyen anticuerpos, peptidocuerpos, proteínas de fusión de Fc, avímeros y otros armazones de proteína, y análogos o variantes o derivados de los mismos, que se puede usar en las composiciones y métodos de la presente invención incluyen las que se unen a una o más de las siguientes, solas o en cualquier combinación:

(i) proteínas CD que incluyen, pero no se limitan a, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD30 y CD34; que incluye las que interfieren con la unión de receptor.

(ii) proteínas de la familia de receptores de HER, que incluyen, por ejemplo, HER2, HER3, HER4, y el receptor de EGF;

(iii) moléculas de adhesión a células, por ejemplo, LFA-1, Mol, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, y alfa v/beta 3 integrina;

(iv) factores de crecimiento, que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular ("VEGF"), hormona de crecimiento, hormona estimulante tiroidea, hormona foliculoestimulante, hormona luteinizante, factor liberador de hormona de crecimiento, hormona paratiroidea, sustancia inhibidora de mulleriana, proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento nervioso, tal como NGF-beta, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos, que incluye, por ejemplo, aFGF y bFGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento transformante (TGF), que incluyen, entre otros, TGF-alfa y TGF-beta, que incluyen TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4, o TGF-beta5, factor de crecimiento similar a las insulinas-I y -II (IGF-I y IGF-II), des(1-3)-IGF-I (IGF-I de cerebro) y factores osteoinductivos;

(v) insulinas y proteínas relacionadas con insulinas, que incluyen, pero no se limitan a, insulina, cadena A de insulina, cadena B de insulina, proinsulina y proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina;

(vi) coagulación y proteínas relacionadas con la coagulación, tales como, entre otros, factor VIII, factor tisular, factor de von Willebrand, proteína C, alfa-1-antitripsina, activadores del plasminógeno, tales como urocinasa y activador tisular del plasminógeno ("t-PA"), bombesina, trombina y trombotocina;

(vii) otras proteínas sanguíneas y séricas, que incluyen, pero no se limitan a, albúmina, IgE y antígenos de grupos sanguíneos;

(viii) factores estimulantes de colonias (CSFs) y receptores de los mismos, que incluyen los siguientes, entre otros, M-CSF, GM-CSF y G-CSF, y receptores de los mismos, tales como receptor de CSF-1 (c-fms);

(ix) receptores y proteínas asociadas a receptor, que incluyen, por ejemplo, receptor flk2/flt3, receptor de obesidad (OB), receptores de la hormona de crecimiento, receptores de trombotocina ("TPO-R," "c-mp1"), receptores de glucagón, receptores de interleucina, receptores de interferón, receptores de linfocitos T, receptores de factor de células madre (scf's), tales como c-Kit, y otros receptores enumerados en el presente documento;

- (x) ligandos de receptor, que incluyen, por ejemplo, OX40L, el ligando para el receptor de OX40 expresado en linfocitos T, y otros ligandos enumerados en el presente documento;
- (xi) factores neurotróficos, que incluyen, pero no se limitan a, factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF) y neurotrofina-3, -4, -5, o -6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6);
- 5 (xii) cadena A de relaxina, cadena B de relaxina y prorelaxina;
- (xiii) interferones y receptores de interferón, que incluyen, por ejemplo, interferón-alfa, -beta y -gamma, y receptores de interferón-alfa, -beta y -gamma;
- (xiv) interleucinas (ILs) y receptores de interleucina, que incluyen, pero no se limitan a, receptores de IL-1 a IL-15 y IL-1 a IL-15, tales como el receptor de IL-8, entre otros;
- 10 (xv) antígenos virales, que incluyen, pero no se limitan a, un antígeno viral de la envuelta del SIDA;
- (xvi) lipoproteínas, calcitonina, glucagón, factor natriurético auricular, tensioactivo pulmonar, factor de necrosis tumoral-alfa y -beta, encefalina, RANTES (regulado después de la activación de linfocitos T normales, expresados y secretados), péptido asociado a gonadotropina de ratón, DNAsa, inhibina y activina;
- 15 (xvii) integrina, proteína A o D, factores reumatoides, inmunotoxinas, proteína morfogenética ósea (BMP), superóxido dismutasa, proteínas de la membrana superficial, factor acelerador de la degradación (DAF), envoltura de SIDA, proteínas de transporte, receptores de recirculación, adhesinas, proteínas reguladoras, inmunoadhesinas, anticuerpos;
- 20 (xviii) miostatinas, proteínas TALL, que incluyen TALL-1, proteínas amiloides, que incluyen, pero no se limitan a, proteínas de amiloide-beta, linfopoyetinas del estroma tímico ("TSLP"), ligando RANK ("OPGL"), c-kit, receptores de TNF, que incluyen receptor de TNF tipo 1, TRAIL-R2, angiopoyetinas, y
- (xix) fragmentos biológicamente activos o análogos o variantes de cualquiera de los anteriores.

En cuanto a todos los anteriores, son particularmente a modo de ejemplo los que son agentes terapéuticos eficaces, particularmente los que ejercen un efecto terapéutico uniendo una diana, particularmente una diana entre los enumerados anteriormente, que incluyen dianas derivadas de los mismos, dianas relacionadas con los mismos, y modificaciones de los mismos.

Proteínas ilustrativas particulares

Los polipéptidos terapéuticos a modo de ejemplo adecuados para su uso en las disoluciones farmacéuticas líquidas y métodos de la invención incluyen eritropoyetina humana (SEQ ID NO: 1) o variantes biológicamente activas, derivados, o análogos de los mismos, que incluyen derivados químicamente modificados. Una proteína a modo de ejemplo es la darbepoetina (SEQ ID NO: 2). La darbepoetina es un análogo de eritropoyetina hiperglicosilado que tiene cinco cambios en la secuencia de aminoácidos de EPO humana recombinante que proporciona dos cadenas de hidrato de carbono unidas en N adicionales en los restos de aminoácidos 30 y 88.

Entre las proteínas ilustrativas particulares están las proteínas específicas expuestas a continuación, que incluyen fusiones, fragmentos, análogos, variantes, o derivados de las mismas:

Los anticuerpos específicos de OPGL, pepticuerpos, y proteínas relacionadas, y similares (también denominados anticuerpos específicos RANKL, pepticuerpos y similares), que incluyen anticuerpos específicos de OPGL completamente humanizados y humanos, particularmente anticuerpos monoclonales completamente humanizados, que incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos descritos en la publicación internacional Número WO 03/002713, en cuanto a anticuerpos específicos de OPGL y proteínas relacionadas con anticuerpos, particularmente las que tiene las secuencias expuestas en ese documento, particularmente, pero no se limitan a, los indicados en su interior: 9H7; 18B2; 2D8; 2E11; 16E1; y 22B3, que incluyen los anticuerpos específicos de OPGL que tienen o la cadena ligera de SEQ ID NO: 2 como se expone en ese documento en la Figura 2 y/o la cadena pesada de SEQ ID NO:4, como se expone en ese documento en la Figura 4.

Las proteínas de unión a miostatina, pepticuerpos, y proteínas relacionadas, y similares, que incluyen pepticuerpos específicos de miostatina, particularmente los descritos en la publicación de solicitud de EE.UU. Número 2004/0181033 y la publicación internacional Número WO 2004/058988, particularmente en las partes referentes a los pepticuerpos específicos de miostatina, que incluyen, pero no se limitan a, pepticuerpos de la familia mTN8-19, que incluye los de SEQ ID NOS: 305-351, que incluyen TN8-19-1 a TN8-19-40, TN8-19 con1 y TN8-19 con2; pepticuerpos de la familia mL2 de SEQ ID NOS: 357-383; la familia mL15 de SEQ ID NOS: 384-409; la familia mL17 de SEQ ID NOS: 410-438; la familia mL20 de SEQ ID NOS: 439-446; la familia mL21 de SEQ ID NOS: 447-452; la familia mL24 de SEQ ID NOS: 453-454; y los de SEQ ID NOS: 615-631.

Los anticuerpos específicos de receptores de IL-4, pepticuerpos, y proteínas relacionadas, y similares, particularmente los que inhiben actividades mediadas por la unión de IL-4 y/o IL-13 al receptor, que incluyen los

descritos en la publicación internacional N° WO 2005/047331 de la solicitud internacional Número PCT/US2004/03742 y en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. número 2005/112694, particularmente en las partes referentes a anticuerpos específicos de receptor de IL-4, particularmente dichos anticuerpos como se describen en ese documento, particularmente, y sin limitación, los designados en ese documento: L1H1; L1H2; L1H3; L1H4; L1H5; L1H6; L1H7; L1H8; L1H9; L1H10; L1H11; L2H1; L2H2; L2H3; L2H4; L2H5; L2H6; L2H7; L2H8; L2H9; L2H10; L2H11; L2H12; L2H13; L2H14; L3H1; L4H1; L5H1; L6H1.

Los anticuerpos específicos de receptor 1 de interleucina 1 ("IL1-R1"), peptidocuerpos, y proteínas relacionadas, y similares, que incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la publicación de solicitud de EE.UU. Número US2004/097712A1 en partes referentes a las proteínas específicas de unión a IL1-R1, anticuerpos monoclonales en particular, especialmente, sin limitación, los designados en ese documento: 15CA, 26F5, 27F2, 24E12 y 10H7.

Los anticuerpos específicos Ang2, peptidocuerpos, y proteínas relacionadas, y similares, que incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la publicación internacional Número WO 03/057134 y la publicación de solicitud de EE.UU. Número US2003/0229023, particularmente en las partes referentes a anticuerpos específicos de Ang2 y peptidocuerpos y similares, especialmente los de las secuencias descritas en ese documento y que incluyen, pero no se limitan a: L1(N); L1(N) WT; L1(N) 1K WT; 2xL1(N); 2xL1(N) WT; Con4 (N), Con4 (N) 1K WT, 2xCon4 (N) 1K; L1C; L1C 1K; 2xL1C; Con4C; Con4C 1K; 2xCon4C 1K; Con4-L1 (N); Con4-L1C; TN-12-9 (N); C17 (N); TN8-8(N); TN8-14 (N); Con 1 (N), que también incluyen anticuerpos anti-Ang 2 y formulaciones tales como aquellas descritas en la publicación internacional Número WO 2003/030833, particularmente Ab526; Ab528; Ab531; Ab533; Ab535; Ab536; Ab537; Ab540; Ab543; Ab544; Ab545; Ab546; A551; Ab553; Ab555; Ab558; Ab559; Ab565; AbF1AbFD; AbFE; AbFJ; AbFK; AbG1D4; AbGC1E8; AbH1C12; Ab1A1; Ab1F; Ab1K, Ab1P; y Ab1P, en sus diversas permutaciones como se describe en ese documento.

Los anticuerpos específicos de NGF, peptidocuerpos, y proteínas relacionadas, y similares, que incluyen, en particular, pero no se limitan a, los descritos en la publicación de solicitud de EE.UU. Número US2005/0074821 y la patente de EE.UU. Número 6.919.426, particularmente en cuanto a anticuerpos específicos de NGF y proteínas relacionadas a este respecto, que incluyen, en particular, pero no se limitan a, los anticuerpos específicos de NGF designados en ese documento 4D4, 4G6, 6H9, 7H2, 14D10 y 14D11.

Los anticuerpos específicos de CD22, peptidocuerpos, y proteínas relacionadas, y similares, tales como los descritos en el documento de patente US 5.789.554 en cuanto a anticuerpos específicos de CD22 y proteínas relacionadas, particularmente anticuerpos específicos de CD22 humano, tales como, pero no se limitan a, anticuerpos humanizados y completamente humanos, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos humanizados y monoclonales completamente humanos, particularmente que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos IgG específicos de CD22 humano, tales como, por ejemplo, un dímero de un disulfuro de cadena gamma hLL2 monoclonal de humano-ratón unido a una cadena kappa hLL2 monoclonal de humano-ratón, que incluye, pero limitado a, por ejemplo, el anticuerpo completamente humanizado específico de CD22 humano en Epratuzumab, número de registro CAS 501423-23-0.

Los anticuerpos específicos de receptor de IGF-1, peptidocuerpos, y proteínas relacionadas, y similares, tales como los descritos en la solicitud de patente internacional Número PCT/US2005/046493, en cuanto a anticuerpos específicos de receptor de IGF-1 y proteínas relacionadas, que incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos específicos de IGF-1 designados en ese documento L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13, L14H14, L15H15, L16H16, L17H17, L18H18, L19H19, L20H20, L21H21, L22H22, L23H23, L24H24, L25H25, L26H26, L27H27, L28H28, L29H29, L30H30, L31H31, L32H32, L33H33, L34H34, L35H35, L36H36, L37H37, L38H38, L39H39, L40H40, L41H41, L42H42, L43H43, L44H44, L45H45, L46H46, L47H47, L48H48, L49H49, L50H50, L51H51, L52H52, y fragmentos de unión a IGF-1R y derivados de los mismos.

Por tanto, entre los ejemplos no limitantes de anticuerpos anti-IGF-1R para su uso en los métodos y composiciones de la presente invención, están cada uno y todos de los descritos en:

Publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 06/0040358 (publicada el 23 de febrero de 2006), 05/0008642 (publicada el 13 de enero de 2005), 04/0228859 (publicada el 18 de noviembre de 2004), que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, anticuerpo 1A (depósito de DSMZ N° DSM ACC 2586), anticuerpo 8 (depósito de DSMZ N° DSM ACC 2589), anticuerpo 23 (depósito de DSMZ N° DSM ACC 2588) y anticuerpo 18 como se describe en ese documento;

Publicación PCT N° WO 06/138729 (publicada el 28 de diciembre de 2006), WO 05/016970 (publicada el 24 de febrero de 2005), y Lu et al., 2004, J Biol Chem. 279:2856-65, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos 2F8, A12 y IMC-A12 como se describe en ese documento;

Publicación PCT N° WO 07/012614 (publicada el 1 de febrero de 2007), WO 07/000328 (publicada el 4 de enero de 2007), WO 06/013472 (publicada el 9 de febrero de 2006) y 05/058967 (publicada el 30 de junio de 2005), 03/059951 (publicada el 24 de julio de 2003);

Publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 05/0084906 (publicada el 21 de abril de 2005), que incluye, pero no se limita a, anticuerpo 7C10, anticuerpo C7C10 quimérico, anticuerpo h7C10, anticuerpo 7H2M,

anticuerpo quimérico *7C10, anticuerpo GM 607, anticuerpo humanizado 7C10 versión 1, anticuerpo humanizado 7C10 versión 2, anticuerpo humanizado 7C10 versión 3 y anticuerpo 7H2HM, como se describe en ese documento;

5 Publicación de solicitud de patente de EE.UU. Nº 05/0249728 (publicada el 10 de noviembre de 2005), 05/0186203 (publicada el 25 de agosto de 2005), 04/0265307 (publicada el 30 de diciembre de 2004), 03/0235582 (publicada el 25 de diciembre de 2003) y Maloney et al., 2003, Cancer Res. 63:5073-83, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpo EM164, EM164 acondicionado superficialmente, EM164 humanizado, huEM164 v1.0, huEM164 v1.1, huEM164 v1.2 y huEM164 v1.3 como se describen en ese documento;

10 Patente de EE.UU. Nº 7.037.498 (concedida el 2 de mayo de 2006), solicitud de patente de EE.UU. Nº 05/0244408 (publicada el 30 de noviembre de 2005), 04/0086503 (publicada el 6 de mayo de 2004), Cohen, et al., 2005, Clinical Cancer Res. 11:2063-73, por ejemplo, anticuerpo CP-751,871, que incluyen, pero no se limitan a, cada uno de los anticuerpos producidos por los hibridomas que tienen los números de acceso ATCC PTA-2792, PTA-2788, PTA-2790, PTA-2791, PTA-2789, PTA-2793, y anticuerpos 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2 y 4.17.3, como se describe en ese documento;

15 Solicitud de patente de EE.UU. Nº 05/0136063 (publicada el 23 de junio de 2005), 04/0018191 (publicada el 29 de enero de 2004), que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpo 19D12 y un anticuerpo que comprende una cadena pesada codificada por un polinucleótido en plásmido 15H12/19D12 HCA (γ4), depositado en ATCC con el número PTA-5214, y una cadena ligera codificada por un polinucleótido en plásmido 15H12/19D12 LCF (κ), depositada en la ATCC con el número PTA-5220, como se describe en ese documento;

20 Solicitud de patente de EE.UU. Nº 04/0202655 (publicada el 14 de octubre de 2004), que incluye, pero no se limita a, anticuerpos PINT-6A1, PINT-7A2, PINT-7A4, PINT-7A5, PINT-7A6, PINT-8A1, PINT-9A2, PINT-11A1, PINT-11A2, PINT-11A3, PINT-11A4, PINT-11A5, PINT-11A7, PINT-11A12, PINT-12A1, PINT-12A2, PINT-12A3, PINT-12A4 y PINT-12A5, como se describe en ese documento; particularmente en cuanto a los anticuerpos anteriormente mencionados, pepticuerpos y proteínas relacionadas, y similares, que se dirigen a
25 receptores de IGF-1.

Los anticuerpos específicos de la proteína 1 relacionada con B-7, pepticuerpos, proteínas relacionadas, y similares ("B7RP-1" también se refiere en la bibliografía como B7H2, ICOSL, B7h y CD275), particularmente anticuerpos IgG2 monoclonales completamente humanos específicos de B7RP, particularmente el anticuerpo monoclonal IgG2 completamente humano que se une al epítipo en el primer dominio de tipo inmunoglobulina de B7RP-1, especialmente los que inhiben la interacción de B7RP-1 con su receptor natural, ICOS, en linfocitos T activados en particular, especialmente, en todos los aspectos anteriores, los desvelados en la solicitud provisional de EE.UU. Número 60/700.265, presentada el 18 de julio de 2005, y la publicación internacional Número WO07/011941, en cuanto a dichos anticuerpos y proteínas relacionadas, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos designados en ese documento como sigue: 16H (que tiene secuencias variables de cadena ligera y variables de cadena pesada de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:7, respectivamente, en ese documento); 5D (que tiene secuencias variables de cadena ligera y variables de cadena pesada de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:9, respectivamente, en ese documento); 2H (que tiene secuencias variables de cadena ligera y variables de cadena pesada SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:10, respectivamente, en ese documento); 43H (que tiene secuencias variables de cadena ligera y variables de cadena pesada de SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:14, respectivamente, en ese documento); 41H (que tiene secuencias variables de cadena ligera y variables de cadena pesada de SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:13, respectivamente, en ese documento); y 15H (que tiene secuencias variables de cadena ligera y variables de cadena pesada de SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:12, respectivamente, en ese documento).

Los anticuerpos específicos de IL-15, pepticuerpos, y proteínas relacionadas, y similares, tales como, en particular, anticuerpos monoclonales humanizados, particularmente anticuerpos tales como los desvelados en las publicaciones de solicitud de EE.UU. Número: US2003/0138421; US2003/023586; US2004/0071702; y la patente de EE.UU. Número 7.153.507 en cuanto a anticuerpos específicos de IL-15 y proteínas relacionadas, que incluyen pepticuerpos, que incluyen particularmente, por ejemplo, pero no se limitan a, anticuerpos HuMax IL-15 y proteínas relacionadas, tales como, por ejemplo, 146B7.

Los anticuerpos específicos de IFN gamma, pepticuerpos, y proteínas relacionadas, y similares, especialmente los anticuerpos específicos de IFN gamma humano, particularmente anticuerpos anti-IFN gamma completamente humanos, tales como, por ejemplo, los descritos en la publicación de solicitud de EE.UU. Número US 2005/0004353, en cuanto a anticuerpos específicos de IFN gamma, particularmente, por ejemplo, los anticuerpos en ese documento designados 1118; 1118*; 1119; 1121; y 1121*. Las secuencias enteras de las cadenas pesadas y ligeras de cada uno de estos anticuerpos, así como las secuencias de sus regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras, y regiones determinantes de la complementariedad, se desvelan en la anterior publicación de solicitud de EE.UU. US 2005/0004353 y en Thakur et al., Mol. Immunol. 36:1107-1115 (1999). Además, se proporciona una descripción de las propiedades de estos anticuerpos en la solicitud de patente de EE.UU. Nº US 2005/0004353. Los anticuerpos específicos incluyen los que tienen la cadena pesada de SEQ ID NO: 17 y la cadena ligera de SEQ ID NO:18; los que tienen la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:6 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:8; los que tienen la cadena pesada de SEQ ID NO:19 y la cadena ligera de SEQ ID NO:20; los que

- 5 tienen la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:10 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:12; los que tienen la cadena pesada de SEQ ID NO:32 y la cadena ligera de SEQ ID NO:20; los que tienen la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:30 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:12; los que tienen la secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO:21 y la secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO:22; los que tienen la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:14 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:16; los que tienen la cadena pesada de SEQ ID NO:21 y la cadena ligera de SEQ ID NO:33; y los que tienen la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:14 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:31, como se desvela en la publicación de patente de EE.UU. N° 2005/0004353. Un anticuerpo específico contemplado es el anticuerpo 1119 como se desvela en la publicación de patente de EE.UU. N° 2005/0004353 y que tiene una cadena pesada completa de SEQ ID NO:17 como se desvela en ese documento y que tiene una cadena ligera completa de SEQ ID NO:18 como se desvela en ese documento.
- 10 Los anticuerpos específicos de TALL-1, pepticuerpos, y las proteínas relacionadas, y similares, y otras proteínas específicas de unión a TALL, tales como las descritas en las publicaciones de solicitud de EE.UU. Número 2003/0195156 y 2006/135431 en cuanto a proteínas de unión a TALL-1, particularmente las moléculas de las Tablas 4 y 5B, como se desvela en la anterior publicación de solicitud de EE.UU.
- 15 Los anticuerpos específicos de hormona paratiroidea ("PTH"), pepticuerpos, y proteínas relacionadas, y similares, tales como los descritos en la patente de EE.UU. Número 6.756.480, particularmente en las partes referentes a proteínas que se unen a PTH.
- 20 Los anticuerpos específicos de receptor de trombopoyetina ("TPO-R"), pepticuerpos, y proteínas relacionadas, y similares, tales como los descritos en la patente de EE.UU. Número 6.835.809, particularmente en las partes referentes a proteínas que se unen a TPO-R.
- 25 Los anticuerpos específicos de factor de crecimiento de hepatocitos ("HGF"), pepticuerpos, y proteínas relacionadas, y similares, que incluyen los que se dirigen al eje HGF/SF:cMet (HGF/SF:cMet), tales como los anticuerpos monoclonales completamente humanos que neutralizan factor de crecimiento de hepatocitos/dispersión (HGF/SF) descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. Número US2005/0118643 y la publicación internacional Número WO2005/017107, huL2G7 descrito en la patente de EE.UU. Número 7.220.410 y OA-5d5 descrito en las patentes de EE.UU. Número 5.686.292, 6.468.529, y en la publicación internacional Número WO 96/38557, particularmente en las partes referentes a proteínas que se unen a HGF.
- 30 Los anticuerpos específicos de TRAIL-R2, pepticuerpos, proteínas relacionadas y similares, tales como los descritos en las solicitudes provisionales de EE.UU. 60/713.433 presentada el 31 de agosto de 2005 y 60/713.478 presentada el 31 de agosto de 2005, particularmente en las partes referentes a proteínas que se unen a TRAIL-R2.
- Los anticuerpos específicos de activina A, pepticuerpos, proteínas relacionadas, y similares, que incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la solicitud de patente provisional de EE.UU. Número 60/843.430 presentada el 8 de septiembre de 2006, particularmente en las partes referentes a proteínas que se unen a activina A.
- 35 Los anticuerpos específicos de TGF-beta, pepticuerpos, proteínas relacionadas, y similares, que incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la patente de EE.UU. Número 6.803.453 y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. Número 2007/110747, particularmente en las partes referentes a proteínas que se unen a TGF-beta.
- 40 Los anticuerpos específicos de proteína amiloide-beta, pepticuerpos, proteínas relacionadas, y similares, que incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la publicación internacional Número WO 2006/081171, particularmente en las partes referentes a proteínas que se unen a proteínas de amiloide-beta. Un anticuerpo contemplado es un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 8 y una región variable de la cadena ligera que tiene SEQ ID NO: 6 como se desvela en documento de patente WO 2006/081171.
- 45 Los anticuerpos específicos de c-Kit, pepticuerpos, proteínas relacionadas, y similares, que incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la solicitud de patente provisional de EE.UU. Número 60/794.771, particularmente en las partes referentes a proteínas que se unen a c-Kit y/u otros receptores de factor de células madre.
- Los anticuerpos específicos de OX40L, pepticuerpos, proteínas relacionadas, y similares, que incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la solicitud de patente de EE.UU. Número 11/068.289, particularmente en las partes referentes a proteínas que se unen a OX40L y/u otros ligandos del receptor de OX40.
- 50 Otras proteínas a modo de ejemplo incluyen Activase® (Alteplase, tPA); Aranesp® (Darbepoetina-alfa), Epogen® (Epoetina alfa, o eritropoyetina); Avonex® (Interferón beta-la); Bexxar® (Tositumomab, anticuerpo monoclonal anti-CD22); Betaseron® (Interferón-beta); Campath® (Alemtuzumab, anticuerpo monoclonal anti-CD52); Dynepo® (Epoetina delta); Velcade® (bortezomib); MLN0002 (mAb anti- α 4 β 7); MLN1202 (mAb de receptor de quimiocinas anti-CCR2); Enbrel® (etanercept, proteína de fusión de receptor de TNF/Fc, bloqueador de TNF); Epex® (Epoetina alfa); Erbitux® (Cetuximab, anti-EGFR / HER1 / c-ErbB-1); Genotropin® (Somatropina, hormona de crecimiento humana); Herceptin® (Trastuzumab, mAb de receptor anti-HER2/neu (erbB2)); Humatrope® (Somatropina, hormona de crecimiento humana); Humira® (Adalimumab); insulina en disolución; Infergen® (Interferón Alfacon-1); Natrecor®
- 55

(nesiritida; péptido natriurético de tipo B humano recombinante (hBNP); Kineret® (Anakinra), Leukine® (Sargamostim, rhuGM-CSF); LymphoCide® (Epratuzumab, mAb anti-CD22); Lymphostat B® (Belimumab, mAb anti-BlyS); Metalyse® (Tenecteplasa, análogo de t-PA); Mircera® (metoxi polietilenglicol-epoetina beta); Mylotarg® (Gemtuzumab ozogamicina); Raptiva® (efalizumab); Cimzia® (certolizumab pegol, CDP 870); Soliris™ (Eculizumab); Pexelizumab (complemento anti-C5); MEDI-524 (Numax®); Lucentis® (Ranibizumab); 17-1A (Edrecolomab, Panorex®); Trabio® (Ierdelimumab); TheraCim hR3 (Nimotuzumab); Omnitarg (Pertuzumab, 2C4); Osidem® (IDM-1); OvaRex® (B43.13); Nuvion® (visilizumab); Cantuzumab mertansine (huC242-DM1); NeoRecormon® (Epoetina beta); Neumega® (Oprelvekin, interleucina-11 humana); Neulasta® (filgrastim pegilado, G-CSF pegilado, hu-Met-G-CSF pegilado); Neupogen® (Filgrastim, G-CSF, hu-MetG-CSF); Orthoclone OKT3® (Muromonab-CD3, anticuerpo monoclonal anti-CD3), Procrit® (Epoetina alfa); Remicade® (Infliximab, anticuerpo monoclonal anti-TNF α), Reopro® (Abciximab, anticuerpo monoclonal anti-receptor GP 1b/IIIA), Actemra® (mAb anti-receptor de IL6), Avastin® (Bevacizumab), HuMax-CD4 (zanolimimumab), Rituxan® (Rituximab, mAb anti-CD20); Tarceva® (Erlotinib); Roferon-A® (Interferón alfa-2a); Simulect® (Basiliximab); Prexige® (lumiracoxib); Synagis® (Palivizumab); 146B7-CHO (anticuerpo anti-IL15, véase U.S.P.N. 7.153.507), Tysabri® (Natalizumab, anticuerpo mAb anti- α 4-integrina); Valortim® (MDX-1303, mAb anti-B. anthracis Protective Antigen); ABThrax™; Vectibix® (Panitumumab); Xolair® (Omalizumab), ETI211 (mAb anti-MRSA), IL-1 Trap (la porción Fc de IgG1 humana y los dominios extracelulares de ambos componentes de receptor de IL-1 (el receptor de tipo I y la proteína accesoria de receptor)), VEGF Trap (dominios de Ig de VEGFR1 fusionados con IgG1 Fc), Zenapax® (Daclizumab); Zenapax® (Daclizumab, mAb anti-IL-2R α), Zevalin® (ibritumomab tiuxetán), Zetia (ezetimiba), Atacicept (TACI-Ig), anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD80 (galiximab), mAb anti-CD23 (lumiliximab), BR2-Fc (proteína de fusión huBR3 / huFc, antagonista de BAFF soluble); CNTO 148 (Golimumab, mAb anti-TNF α); HGS-ETR1 (Mapatumumab; mAb humano anti-receptor-1 de TRAIL); HuMax-CD20 (Ocrelizumab, mAb humano anti-CD20); HuMax-EGFR (zalutumumab); M200 (Volociximab, mAb anti-integrina α 5 β 1); MDX-010 (Ipilimumab, mAb anti-CTLA-4 y VEGFR-1 (IMC-18F1); mAb anti-BR3; mAbs anti-toxina A y toxina B C de *C. difficile* MDX-066 (CDA-1) y MDX-1388); conjugados anti-dsFv de CD22-PE38 (CAT-3888 y CAT-8015); mAb anti-CD25 (HuMax-TAC); mAb anti-CD3 (NI-0401); Adecatumumab; mAb anti-CD30 (MDX-060); MDX-1333 (anti-IFNAR); mAb anti-CD38 (HuMax CD38); mAb anti-CD40L; mAb anti-Cripto; fibrógeno de fibrosis pulmonar idiopática de fase I anti-CTGF (FG-3019); mAb anti-CTLA4; mAb anti-eotaxina 1 (CAT-213); mAb anti-FGF8; mAb anti-gangliósido GD2; mAb anti-gangliósido GM2; mAb humano anti-GDF-8 (MYO-029); mAb anti-receptor de GM-CSF (CAM-3001); mAb anti-HepC (HuMaxHepC); mAb anti-IFN α (MEDI-545, MDX-1103); mAb anti-IGF1R; mAb anti-IGF-1R (HuMax-Inflam); mAb anti-IL12 (ABT-874); mAb anti-IL12/IL23 (CNTO 1275); mAb anti-IL13 (CAT-354); mAb anti-IL2Ra (HuMax-TAC); mAb anti-receptor de IL5; mAb anti-receptores de integrina (MDX-018, CNTO 95); mAb anti-colitis ulcerosa IP 10 (MDX-1100); anticuerpo anti-LLY; BMS-66513; mAb anti-receptor de manosa/hCG β (MDX-1307); conjugado anti-mesotelina dsFv-PE38 (CAT-5001); mAb anti-PD1 (MDX-1106 (ONO-4538)); anticuerpo anti-PDGFR α (IMC-3G3); mAb anti-TGF β (GC-1008); mAb humano anti-receptor-2 de TRAIL (HGS-ETR2); mAb anti-TWEAK; mAb anti-VEGFR/Flt-1; mAb anti-ZP3 (HuMax-ZP3); anticuerpo NVS N° 1; y anticuerpo NVS N° 2.

Variación de secuencias

Las proteínas particularmente a modo de ejemplo con respecto a todo lo anterior y lo siguiente incluyen las que comprenden una región que es 70 % o más, 80 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 97 % o más, 98 % o más, o 99 % o más idéntica en secuencia de aminoácidos a una secuencia de referencia de aminoácidos de una proteína de unión, como se ilustra anteriormente, particularmente una proteína de unión farmacéutica, tal como una secuencia de GenBank u otra secuencia de referencia de una proteína de referencia.

La identidad a este respecto se puede determinar usando una variedad de software de análisis de secuencias de aminoácidos bien conocido y fácilmente disponible. El software a modo de ejemplo incluye los que implementan los algoritmos de Smith-Waterman, considerados una solución satisfactoria al problema de secuencias de búsqueda y alineación. También se pueden emplear otros algoritmos, particularmente donde la velocidad sea una consideración importante. Los programas comúnmente empleados para el alineamiento y la correspondencia de homología de ADNs, ARNs y polipéptidos que se pueden usar a este respecto incluyen FASTA, TFASTA, BLASTN, BLASTP, BLASTX, TBLASTN, PROSRCH, BLAZE y MPSRCH, siendo el último una implementación del algoritmo de Smith-Waterman para la ejecución en procesadores paralelos a gran escala fabricados por MasPar.

Los programas BLASTN, BLASTX y BLASTP son, entre los programas a modo de ejemplo para dichas determinaciones, el primero para comparaciones de secuencias de polinucleótidos y los dos últimos para comparaciones de secuencias de polipéptidos; particularmente BLASTX para comparación de las secuencias de polipéptidos de los tres marcos de lectura de secuencia de polinucleótidos y BLASTP para una única secuencia de polipéptidos.

BLAST proporciona una variedad de parámetros definibles por usuario que son fijados antes de implementar una comparación. Algunos de ellos son más fácilmente evidentes que otros en interfaces gráficas de usuario, tales como los proporcionados por NCBI BLAST y otros programas de alineamiento de secuencias a los que se puede acceder por internet. Los ajustes y sus valores se exponen y se explican en los sitios web de servicio y se exponen y se explican con detalle particular en una variedad de textos fácilmente disponibles, que incluyen, pero no se limitan a, BIOINFORMATICS: SEQUENCE AND GENOME ANALYSIS, 2ª Ed., David W. Mount, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2004), especialmente los Capítulos 3, 4, 5 y 6 en cuanto a la

comparación de secuencias de proteínas y de ácidos nucleicos, en general, y en cuanto a comparaciones y búsquedas de BLAST en particular; SEQUENCE ANALYSIS IN A NUTSHELL: A GUIDE TO COMMON TOOLS AND DATABASES, Scott Markel y Darril Leon, O'Reilly & Associates, Sebastopol, California (2003), especialmente el Capítulo 7 en cuanto a BLAST, en particular, particularmente en las partes referentes a la comparación de secuencias de nucleótidos y de polipéptidos y a la determinación de su grado de identidad, similitud, homología y/o similares, especialmente en cuanto a la comparación de una secuencia de prueba y una secuencia de referencia para calcular un grado (porcentaje) de identidad entre ellas.

En realizaciones a modo de ejemplo de la divulgación a este respecto, la vinculación de secuencias se define como la puntuación de identidad en porcentaje devuelta por una cualquiera u otra de las búsquedas de comparación de BLAST anteriormente mencionadas con $e = 10$ y todos los otros parámetros fijados a sus valores por defecto en el servidor de internet de NCBI como se expone en SEQUENCE ANALYSIS IN A NUTSHELL: A GUIDE TO COMMON TOOLS AND DATABASES, Scott Markel y Darril Leon, O'Reilly & Associates, Sebastopol, California (2003), páginas 47-51, y en todos los datos de los ajustes a modo de ejemplo para los parámetros de la presente divulgación para comparar secuencias usando BLAST, tal como aquellos en NCBI BLAST.

Las siguientes referencias proporcionan información adicional sobre comparaciones de secuencias a este respecto, y en otros. GUIDE TO HUMAN GENOME COMPUTING, Ed. Martin J. Bishop, Academic Press, Harcourt Brace & Company Publishers, New York (1994), particularmente en las partes referentes a determinar la identidad y u homología de secuencias de aminoácidos o polinucleótidos, especialmente el Capítulo 7. Los programas de BLAST se describen en Altschul et al., "Basic Local Alignment Research Tool," J Mol Biol 215: 403-410 (1990). Información adicional referente al análisis de secuencias y determinaciones de homología e identidad se proporcionan en, entre muchas otras referencias bien conocidos y fácilmente disponibles para los expertos en la técnica: NUCLEIC ACID AND PROTEIN SEQUENCE ANALYSIS: A PRACTICAL APPROACH, Eds. M. J. Bishop and C. J. Rawings, IRL Press, Oxford, UK (1987); PROTEIN STRUCTURE: A PRACTICAL APPROACH, Ed. T. E. Creighton, IRL Press, Oxford, UK (1989); Doolittle, R. F.: "Searching through sequence databases", Met Enz. 183: 99-110 (1990); Meyers and Miller: "Optimal alignments in linear space" Comput. Applic. in Biosci 4: 11-17 (1988); Needleman and Wunsch: "A general method applicable to the search for similarities in amino acid sequence of two proteins," J Mol Biol 48: 443-453 (1970) y Smith and Waterman "Identification of common molecular subsequences", J Mol Biol 147: 1950 et seq. (1981), particularmente en las partes referentes a comparación de secuencias y determinaciones de identidad y homología.

II. Preparación de formulaciones

Son comercialmente deseables formulaciones farmacéuticas estables de proteína terapéutica con degradación, precipitación y/o agregación mínima. En particular, cuando se van a administrar grandes dosis de proteína terapéutica en un pequeño volumen de líquido, es altamente deseable proporcionar formulaciones con altas concentraciones de proteína que no presentan la elevada viscosidad normalmente observada con dichas altas concentraciones de proteína. Las formulaciones de alta viscosidad son difíciles de manipular durante la fabricación, que incluye en las etapas a granel y de llenado. Además, las formulaciones de alta viscosidad son difíciles de cargar en una jeringa e inyectar, necesitando frecuentemente el uso de agujas de menor calibre. Las disoluciones de proteína también tienen las posibilidades de formulación en partículas y agregación, que pueden afectar la actividad, eficacia y posiblemente inmunogenicidad de la proteína terapéutica. Como se muestra en el presente documento, la adición de creatinina/creatina o carnitina a las disoluciones de proteína biológicamente activa reduce inesperadamente la viscosidad de las disoluciones de proteína y también reduce la agregación de proteínas observada en condiciones de estrés térmico.

El uso de un excipiente seleccionado del grupo que consiste en creatinina, creatina, carnitina, o mezclas de las mismas, permite una mayor concentración de las proteínas terapéuticas que se van a usar en la formulación sin un aumento concomitante en la viscosidad y/o agregación. La estabilidad mejorada de la agregación reducida da como resultado una formulación con una elevada estabilidad en almacén, particularmente a temperatura de refrigerador, pero también a temperaturas más altas también, por ejemplo, temperatura ambiente.

Así, la invención proporciona un método de reducción de la viscosidad de disoluciones farmacéuticas líquidas de proteína añadiendo un excipiente seleccionado del grupo que consiste en creatinina, creatina, carnitina, o mezclas de las mismas, en una cantidad eficaz para reducir la viscosidad. La invención también proporciona disoluciones farmacéuticas líquidas de viscosidad reducida de proteína terapéutica, que incluyen anticuerpo, que contiene cantidades eficaces o concentraciones de un excipiente seleccionado del grupo que consiste en creatinina, creatina, carnitina, o mezclas de las mismas. También se contempla en la presente divulgación métodos de cribado de una o más formulaciones, conteniendo cada una diferentes concentraciones de creatinina, creatina, carnitina, o mezclas de las mismas, para identificar concentraciones adecuadas u óptimas que reducen la viscosidad y/o agregación. Se proporcionan además métodos de preparación de un polvo liofilizado a partir de disoluciones farmacéuticas líquidas de viscosidad reducida de la invención, y métodos de reconstitución de los polvos liofilizados de la invención mediante la adición de un diluyente estéril.

Así, la presente invención proporciona disoluciones farmacéuticas líquidas que contienen polipéptidos biológicamente activos y concentraciones reductoras de la viscosidad de excipientes. La reducción en la viscosidad

es al menos 10-70 % frente a los controles sin excipiente. En una realización, la reducción en la viscosidad varía desde 10-30 %. En otras realizaciones a modo de ejemplo, la reducción en la viscosidad es al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 % o 65 %.

5 Las formulaciones estables pueden presentar una mayor estabilidad en almacén a 2-8 °C (temperatura de refrigerador), por ejemplo, al menos 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses, 1 año, 18 meses o 2 años, y también da como resultado una mayor estabilidad en almacén a otras temperaturas, tales como 25-30 °C (temperatura ambiente).

Las disoluciones farmacéuticas líquidas de la invención pueden incluir opcionalmente sales farmacéuticamente aceptables, tampones, tensioactivos, excipientes, vehículos, diluyentes, y/u otros agentes de formulación.

10 Los tampones farmacéuticamente aceptables a modo de ejemplo incluyen acetato (por ejemplo, acetato sódico), succinato (tal como succinato sódico), gluconato, histidina, citrato u otros tampones de ácido orgánico. La concentración de tampón a modo de ejemplo puede ser desde aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 200 mM, o desde aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 60 mM, dependiendo, por ejemplo, del tampón y la tonicidad deseada (por ejemplo, isotónico, hipertónico o hipotónico) de la disolución. Los pHs a modo de ejemplo
15 incluyen desde aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 6,5, o desde aproximadamente 4,8 hasta aproximadamente 5,5, o desde 4 hasta 6, o 5 hasta 5,5, o aproximadamente 5, superior a aproximadamente 5, superior a aproximadamente 5,5, superior a aproximadamente 6, o superior a aproximadamente 6,5.

Los diluyentes, excipientes, o vehículos adecuados, y otros agentes, incluyen, pero no se limitan a, antioxidantes, colorantes, aromatizantes y agentes de dilución, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, disolventes, cargas, agentes de carga, tampones, vehículos, diluyentes, excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Por ejemplo,
20 un vehículo adecuado puede ser solución salina fisiológica, solución salina tamponada con citrato, o CSF artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. La solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina de suero son vehículos adicionales a modo de ejemplo. Los expertos en la técnica reconocerían fácilmente una variedad de tampones que se podrían
25 usar en las composiciones, y formas farmacéuticas usadas en la invención. Los tampones típicos incluyen, pero no se limitan a, ácidos débiles farmacéuticamente aceptables, bases débiles, o mezclas de los mismos. Los componentes de tampón a modo de ejemplo son materiales solubles en agua tales como ácido fosfórico, ácidos tartáricos, ácido láctico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido acético, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido glutámico, o sales de los mismos. Las sales a modo de ejemplo incluyen ácidos inorgánicos y orgánicos, o bases,
30 tales como metales o aminas, en concentraciones a modo de ejemplo tales como aproximadamente 50-200 mM, o 100-200 mM, o aproximadamente 100 mM, o aproximadamente 150 mM.

También se pueden incluir otros excipientes o estabilizadores, por ejemplo, azúcares (por ejemplo, sacarosa, glucosa, trehalosa, fructosa, xilosa, manitosa, fucosa), polioles (por ejemplo, glicerol, manitol, sorbitol, glicol, inositol),
35 aminoácidos o derivados de aminoácidos (por ejemplo, glicina, glicina betaína, prolina, valina, leucina, alanina, glutamina, taurina), o tensioactivos (por ejemplo, polisorbato, que incluye polisorbato 20, o polisorbato 80, o poloxámero, que incluye poloxámero 188). Las concentraciones de tensioactivo a modo de ejemplo pueden variar desde aproximadamente 0,001 % hasta aproximadamente 0,5 %, o desde aproximadamente 0,005 % hasta aproximadamente 0,2 %. También se pueden incluir conservantes, tales como alcohol bencílico, fenol, m-cresol, clorobutanol o Cl de bencetonio, por ejemplo, a concentraciones que varían desde aproximadamente 0,1 % hasta
40 aproximadamente 2 %, o desde aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 1 %.

Se pueden incluir uno o varios de otros vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables tales como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980) en la formulación, a condición de que no afecten adversamente las características deseadas de la formulación.

45 La concentración de proteína terapéutica, tal como anticuerpo, en la disolución farmacéutica líquida dependerá del uso final de la disolución farmacéutica líquida y puede ser fácilmente determinada por un experto en la materia. Las proteínas terapéuticas que son antagonistas se administran frecuentemente a mayores concentraciones que las que son agonistas. Las concentraciones de proteínas terapéuticas (sin tener en cuenta el peso de modificaciones químicas tales como pegilación), que incluyen anticuerpos, son al menos 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150,
50 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 mg/mL, y/o inferiores a aproximadamente 250, 300, 350, 400, 450 o 500 mg/mL. Las altas concentraciones de proteína terapéutica a modo de ejemplo, tales como anticuerpo, en la disolución farmacéutica líquida pueden variar desde al menos aproximadamente 100 mg/mL hasta aproximadamente 500 mg/mL. También se contemplan otras concentraciones de proteína (sin tener en cuenta el peso de modificaciones químicas tales como pegilación), por ejemplo, al menos aproximadamente 1, 5, 10, 20, 30, 35, 40,
55 45, 50, 55, 60, 65 o 70 mg/mL. La invención contempla particularmente disoluciones farmacéuticas líquidas y métodos en los que la concentración de proteína terapéutica da como resultado una viscosidad de al menos 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30 cP o más alta y la inclusión de creatina, creatinina, carnitina, o una combinación de las mismas da como resultado la reducción de la viscosidad en 5 % o mayor. Por ejemplo, una disolución con una viscosidad de aproximadamente 20 cP puede ser difícil de inyectar con una aguja estándar de calibre 27. Con respecto a anticuerpos o proteínas de un peso molecular de aproximadamente 150 kD o más alto, concentraciones
60 de aproximadamente 70 mg/mL o más altas se pueden asociar a dicha elevada viscosidad. Con respecto a proteínas

más pequeñas, por ejemplo de un peso molecular de aproximadamente 75 kD o menos, por ejemplo 50 kD o menos, concentraciones de aproximadamente 30 mg/mL o más altas se pueden asociar a dicha elevada viscosidad. La modificación química de dichas proteínas más pequeñas puede provocar que aumente la viscosidad de disoluciones que contienen la proteína modificada con respecto a la proteína no modificada. Todas las referencias a concentración en mg/mL de proteína terapéutica, peso de proteína terapéutica (mg) o peso molecular de proteína terapéutica (kD) en el presente documento significan el peso respectivo de la parte proteínica de la proteína terapéutica, excluyendo cualquier modificación no proteínica.

También se refiere a un método de reducción de la viscosidad de una formulación farmacéutica líquida de una proteína terapéutica, combinando la proteína terapéutica y una cantidad reductora de la viscosidad de un excipiente seleccionado del grupo que consiste en creatinina, creatina o carnitina, o mezclas de las mismas. En casos a modo de ejemplo, la proteína terapéutica está a una alta concentración de proteína como se ha descrito anteriormente. En algunos casos, la reducción en la viscosidad es al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 % o 70 % en comparación con los controles sin excipiente. En otros casos, la reducción en la agregación inducida por estrés térmico es al menos aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 % o 70 % en comparación con los controles sin excipiente.

Las disoluciones farmacéuticas líquidas proporcionadas comprenden una proteína terapéutica y un excipiente seleccionado del grupo que consiste en creatinina, creatina o carnitina, o mezclas de las mismas, en donde las disoluciones presentan viscosidad reducida con respecto a los controles sin excipiente. La proteína terapéutica está a una concentración de al menos 70 mg/mL. El excipiente está presente a una concentración reductora de la viscosidad (peso:volumen). Se puede usar cualquiera de estos excipientes a concentraciones hasta su límite de solubilidad. Dichas disoluciones pueden comprender además un azúcar u otro poliol tal como sacarosa o sorbitol, en una cantidad eficaz para mejorar además la estabilidad, reducir la agregación, y/o hacer la formulación isotónica, sin aumentar significativamente la viscosidad.

En realizaciones a modo de ejemplo, la concentración de creatina/creatinina es aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 300 mM, o aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 750 mM. En realizaciones a modo de ejemplo, la concentración de creatina/creatinina es al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 750 μ M. En realizaciones adicionales a modo de ejemplo, la concentración de creatina/creatinina es al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 75 o 100 mM. En cualquiera de las realizaciones precedentes, la concentración de creatina/creatinina es hasta aproximadamente 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 o 750 mM.

En otras realizaciones a modo de ejemplo, la concentración de carnitina es aproximadamente 5 a aproximadamente 300 mM, o aproximadamente 25 a aproximadamente 400 mM, o aproximadamente 100 a aproximadamente 300 mM. En realizaciones adicionales a modo de ejemplo, la concentración de carnitina es al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, o 100 mM, y/o hasta aproximadamente 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, o 950 mM, o 1, 1,5, 2, 2,5, o 3 M.

En otro aspecto, la invención proporciona formulaciones liofilizadas de proteína que comprenden una proteína terapéutica y un excipiente seleccionado del grupo que consiste en creatinina, creatina o carnitina, o mezclas de las mismas, en donde con la reconstitución con la cantidad recomendada de diluyente, las formulaciones presentan viscosidad reducida con respecto a los controles sin excipiente. La proteína terapéutica está a una alta concentración de proteína como se ha descrito anteriormente. El excipiente está presente a una cantidad eficaz para reducir la viscosidad con la reconstitución con diluyente (concentración peso: peso); en otras realizaciones a modo de ejemplo el excipiente está presente a una concentración reductora de la agregación (peso: peso). Dichas formulaciones pueden comprender además un azúcar u otro poliol, tal como sacarosa o sorbitol, en una cantidad eficaz para mejorar además la estabilidad, reducir la agregación, y/o hacer la formulación isotónica, sin aumentar significativamente la viscosidad.

En algunas realizaciones, la concentración de creatina/creatinina es al menos 4 ng por mg de proteína terapéutica, hasta 1,25 mg por mg de proteína terapéutica. En algunas realizaciones, la concentración de creatina/creatinina es al menos aproximadamente 4, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 750 ng por mg de proteína terapéutica. En aún otras realizaciones, la concentración de creatina/creatinina es al menos aproximadamente 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 μ g por mg de proteína terapéutica. En cualquiera de las realizaciones precedentes, la concentración de creatina/creatinina es hasta aproximadamente 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 o 1250 μ g por mg de proteína terapéutica.

En otras realizaciones, la concentración de carnitina es al menos 2 μ g por mg de proteína terapéutica, hasta 7 mg por mg de proteína terapéutica. En algunas realizaciones, la concentración de carnitina es al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 μ g por mg de proteína terapéutica. En cualquiera de las realizaciones precedentes, la concentración de carnitina puede ser hasta aproximadamente 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, o 950 μ g o hasta aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 mg por mg de proteína terapéutica.

También se refiere a un método de prevención de la auto-asociación de proteínas en formulaciones líquidas usando creatina/creatinina o carnitina como excipientes en cualquiera de las cantidades o concentraciones descritas en el presente documento. También se refiere a formulaciones con estabilidad (por ejemplo, agregación reducida) y estabilidad en almacén mejoradas.

- 5 También se refiere a un kit que comprende una formulación de proteína líquida de la invención, e instrucciones para su administración, opcionalmente con un recipiente, jeringa y/u otro dispositivo de administración. También se refiere a un kit que comprende una formulación de proteína liofilizada de la invención, opcionalmente en un recipiente, e instrucciones para su reconstitución y administración, opcionalmente con un vial de diluyente estéril, y opcionalmente con una jeringa u otro dispositivo de administración. Los recipientes a modo de ejemplo incluyen viales, tubos, 10 botellas, jeringas precargadas de una o múltiples cámaras, o cartuchos. Los dispositivos de administración a modo de ejemplo incluyen jeringas, con o sin agujas, bombas de infusión, inyector de chorro, dispositivos de pluma, inyector transdérmicos, u otro inyector sin aguja, o un dispositivo de aerosolización para administración nasal o pulmonar.

Evaluación de la viscosidad o estabilidad

- 15 También se refiere a un método proporcionado para cribar una concentración reductora de la viscosidad de excipiente que comprende las etapas de: (1) evaluar la viscosidad de una primera disolución que comprende una primera concentración de excipiente(s) seleccionados del grupo que consiste en creatinina, creatina, carnitina y mezclas de las mismas, y una proteína terapéutica, tal como un anticuerpo, (2) evaluar la viscosidad de una segunda disolución que comprende una segunda concentración diferente de excipiente(s) y la proteína terapéutica, y (3) 20 determinar que la primera concentración de excipiente(s) sea más reductora de la viscosidad que la segunda concentración de excipiente si la primera disolución es menos viscosa. La viscosidad se puede determinar, por ejemplo, usando un reómetro Brookfield RV-DVIII que se estabiliza a 25 °C con un baño de temperatura en circulación. Se pipetea quinientos microlitros de muestra en el reómetro y se ajustan las rpm para el porcentaje de valores de par de fuerzas entre 10-80 %. Se deja que las muestras se estabilicen en ese intervalo y se recogen 25 puntos de datos.

Se proporcionan métodos similares para cribar una concentración reductora o estabilizadora de la agregación de excipiente.

- Se puede evaluar la estabilidad de muchas formas, que incluye monitorizar el cambio conformacional con respecto a un intervalo de temperaturas (termostabilidad) y/o periodos de tiempo (estabilidad en almacén) y/o después de 30 exposición a situaciones estresantes de manipulación (por ejemplo, agitación física). Se puede medir la estabilidad de formulaciones que contienen concentraciones variables de componentes de formulación usando una variedad de métodos. Por ejemplo, se puede medir la cantidad de proteína de agregación por observación visual de turbidez, midiendo la absorbancia a una longitud de onda específica, por cromatografía de exclusión por tamaño (en la que los 35 agregados de una proteína eluirán en diferentes fracciones en comparación con la proteína en su estado activo nativo), HPLC, u otros métodos cromatográficos. Se pueden usar otros métodos de medición del cambio conformacional, que incluyen usar calorimetría diferencial de barrido (DSC), por ejemplo, para determinar la temperatura de desnaturalización, o dicroísmo circular (CD), que mide la elipticidad molar de la proteína. También se puede usar la fluorescencia para analizar la composición. La fluorescencia engloba la liberación o absorción de energía en forma de luz o calor, y cambios en las propiedades polares de luz. La emisión de fluorescencia puede ser 40 intrínseca a una proteína o puede ser debida a una molécula indicadora de fluorescencia. Por ejemplo, ANS es una sonda fluorescente que se une a los sitios hidrófobos de proteínas parcialmente desplegadas. A medida que aumenta la concentración de proteína desplegada, aumenta el número de sitios hidrófobos y posteriormente aumenta la concentración de ANS que puede unir. Este aumento en la unión de ANS se puede monitorizar por detección de la señal de fluorescencia de una muestra de proteína. Se pueden usar otros medios para medir la 45 estabilidad y se conocen bien por los expertos en la técnica.

La invención será más completamente entendida como referencia a los siguientes ejemplos que detallan realizaciones a modo de ejemplo de la invención. No se deben interpretar, sin embargo, como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

50 **Ejemplo 1**

- Se estudiaron los efectos de la concentración de proteína sobre la viscosidad de formulaciones de anticuerpo que contienen Anticuerpo A, un anticuerpo IgG1, a pH 5-5,2. Primero, se formularon 70 mg/mL de Anticuerpo A en acetato sódico 10 mM 9 % de sacarosa a pH 5,20 y se dializó contra 4 litros de acetato de Na 10 mM a pH 5,20. La diálisis se llevó a cabo a 4 °C durante la noche usando un tubo de diálisis plisado en piel de serpiente de 55 10.000 MWCO. A continuación, se filtró el Anticuerpo A a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,22 µm. Se concentró la proteína sometiendo a centrifugación con filtro de celulosa regenerada de Amicon Ultra (100.000 MWCO) a 3500 rpm durante 2-3 horas a 20 °C. Se recogió la proteína del filtro en tubos Falcon de 15 mL y se mezcló por inversión. Se determinó la concentración de proteína mediante espectrofotometría y se ajustó la

concentración a 235 mg/mL. Se agitaron con vórtex las muestras durante 10 segundos y luego se dejó que se asentaran durante 1 hora al menos (para equilibrar hasta temperatura ambiente y desgasificar burbujas). Se encendió un reómetro Brookfield RV-DVIII y se estabilizó la temperatura a 25 °C con un baño de temperatura circulante. Se pipetearon quinientos microlitos de muestra en el reómetro y se ajustaron las rpm para conseguir el porcentaje de valores de par de fuerzas entre 10-80 %. Se dejó que las muestras se estabilizaran en ese intervalo y se recogieron puntos de datos.

Ejemplo 2

Se usó la formulación del Ejemplo 1 para determinar si las concentraciones de creatina y creatinina seguían estables en equilibrio con el tiempo. Como se puede apreciar en la Figura 1, una formulación 275 mM de creatina/creatinina contendrá creatinina 225 mM + creatina 50 mM en equilibrio a pH 5,20. Además, estas concentraciones siguen estacionarias durante el transcurso de dos semanas a una temperatura de 80 °C, que indica que los excipientes son altamente estables en disolución.

Ejemplo 3

Para confirmar eso, en equilibrio, las cantidades de creatina/creatinina presentes en la formulación son idénticas tanto si se empieza con o creatina o creatinina, se preparó una formulación con cada una como material de partida. Primero, se formularon 70 mg/mL de Anticuerpo A en acetato sódico 10 mM 9 % de sacarosa a pH 5,20 y se dializó contra 4 litros de acetato de Na 10 mM a pH 5,20. La diálisis se llevó a cabo a 4 °C durante la noche usando un tubo de diálisis plisado en piel de serpiente de 10.000 MWCO. A continuación, se filtró el Anticuerpo A a través de un filtro de acetato de celulosa 0,22 µm. Se formuló el Anticuerpo A dializado hasta creatina 50 mM y creatinina 50 mM en tubos cónicos de 15 mL. Se concentró la proteína sometiendo a centrifugación con filtro de celulosa regenerada Amicon Ultra (100.000 MWCO) a 3500 rpm durante 2-3 horas a 20 °C. Se recogió la proteína del filtro en tubos Falcon de 15 mL y se mezcló por inversión. Se determinó la concentración de proteína mediante espectrofotometría y se ajustó la concentración a 235 mg/mL. Se agitaron con vórtex las muestras durante 10 segundos y luego se dejó que se asentaran durante 1 hora al menos (para equilibrar hasta temperatura ambiente y desgasificar burbujas). Se encendió un reómetro Brookfield RV-DVIII y se estabilizó la temperatura a 25 °C con un baño de temperatura circulante. Se pipetearon quinientos microlitos de muestra en el reómetro y se ajustaron las rpm para conseguir el porcentaje de valores de par de fuerzas entre 10-80 %. Se dejó que las muestras se estabilizaran en ese intervalo y se recogieron puntos de datos. Como se puede apreciar en la Figura 2, la reducción en la viscosidad de la formulación es la misma independientemente de si empieza con creatina o creatinina 50 mM. En cualquier caso, se muestra que la reducción en la viscosidad de la formulación es aproximadamente 30 %.

Ejemplo 4

Se probaron los efectos de aumentar la concentración de excipiente en formulaciones farmacéuticas, y los resultados se muestran en la Figura 3. Primero, se formularon 70 mg/mL de Anticuerpo A en acetato sódico 10 mM 9 % de sacarosa a pH 5,20 y se dializó contra 4 litros de acetato de Na 10 mM a pH 5,20. Se llevó a cabo la diálisis a 4 °C durante la noche usando un tubo de diálisis plisado en piel de serpiente de 10.000 MWCO. A continuación, se filtró el Anticuerpo A a través de un filtro de acetato de celulosa 0,22 µm. Se concentró la proteína sometiendo a centrifugación con filtro de celulosa regenerada Amicon Ultra (100.000 MWCO) a 3500 rpm durante 2-3 horas a 20 °C. Se recogió la proteína del filtro en tubos Falcon de 15 mL y se mezcló por inversión. Para conseguir creatinina 138 mM, se mezclaron 500 µl de Anticuerpo A/creatinina 275 mM con 500 µl de control de Anticuerpo A. Se agitó con vórtex la mezcla durante 10 segundos y luego se dejó que las muestras se asentaran durante 1 hora al menos (para equilibrar hasta temperatura ambiente y desgasificar burbujas). Se encendió un reómetro Brookfield RV-DVIII y se estabilizó la temperatura a 25 °C con un baño de temperatura circulante. Se pipetearon quinientos microlitos de muestra en el reómetro y se ajustaron las rpm para conseguir el porcentaje de valores de par de fuerzas entre 10-80 %. Se dejó que las muestras se estabilizaran en ese intervalo y se recogieron puntos de datos. Se observa que la reducción en la viscosidad es directamente proporcional a la concentración de excipiente usado, siendo la viscosidad reducida en aproximadamente 75 % cuando se usó una concentración de partida de creatinina 275 mM (creatinina 225 mM/creatinina 50 mM en equilibrio).

Ejemplo 5

Como un método de determinación del intervalo de concentración eficaz de creatinina en formulaciones farmacéuticas, se hizo un análisis de valoración usando concentraciones que variaron desde creatinina 0-50 mM. Primero, se formularon 70 mg/mL de Anticuerpo A en acetato sódico 10 mM 9 % de sacarosa a pH 5,20 y se dializó contra 4 litros de acetato de Na 10 mM a pH 5,20. Se llevó a cabo la diálisis a 4 °C durante la noche usando un tubo de diálisis plisado en piel de serpiente de 10.000 MWCO. A continuación, se filtró el Anticuerpo A a través de un filtro de acetato de celulosa 0,22 µm. Se concentró la proteína sometiendo a centrifugación con filtro de celulosa regenerada Amicon Ultra (100.000 MWCO) a 3500 rpm durante 2-3 horas a 20 °C. Se recogió la proteína del filtro en tubos Falcon de 15 mL y se mezcló por inversión. Se mezclaron novecientos cincuenta microlitros de Anticuerpo A concentrado con 50 µl de creatinina a concentraciones variables. Las concentraciones finales de creatinina variaron desde creatinina 50-1 mM. Se agitó con vórtex la mezcla durante 10 segundos y luego se dejó que las muestras se asentaran durante 1 hora al menos (para equilibrar hasta temperatura ambiente y desgasificar burbujas). Se

encendió un reómetro Brookfield RV-DVIII y se estabilizó la temperatura a 25 °C con un baño de temperatura circulante. Se pipetearon quinientos microlitos de muestra en el reómetro y se ajustaron las rpm para conseguir el porcentaje de valores de par de fuerzas entre 10-80 %. Se dejó que las muestras se estabilizaran en ese intervalo y se recogieron puntos de datos. Los resultados del experimento se pueden observar en la Figura 4. Otra vez, el análisis confirma que la viscosidad de la formulación se reduce en un modo lineal con respecto a concentraciones crecientes de excipiente.

Ejemplo 6

Primero, se formularon 70 mg/mL de Anticuerpo A en acetato sódico 10 mM 9 % de sacarosa a pH 5,20 y se dializó contra 4 litros de acetato de Na 10 mM a pH 5,20. Se llevó a cabo la diálisis a 4 °C durante la noche usando un tubo de diálisis plisado en piel de serpiente de 10.000 MWCO. A continuación, se filtró el Anticuerpo A a través de un filtro de acetato de celulosa 0,22 µm. Se recogió la proteína del filtro en tubos Falcon de 15 mL y se mezcló por inversión. Se mezclaron novecientos cincuenta microlitros de Anticuerpo A concentrado con 50 µl de creatina a concentraciones variables. Las concentraciones finales de creatina variaron desde creatina 0,001 - 0,1 mM. Se agitó con vórtex la mezcla durante 10 segundos y luego se dejó que las muestras se asentaran durante al menos 1 hora para equilibrar hasta temperatura ambiente y reducir burbujas. Se encendió un reómetro Brookfield RV-DVIII y se estabilizó la temperatura a 25 °C con un baño de temperatura circulante. Se pipetearon quinientos microlitos de muestra en el reómetro y se ajustaron las rpm para conseguir el porcentaje de valores de par de fuerzas entre 10-80 %. Se dejó que las muestras se estabilizaran en ese intervalo y se recogieron puntos de datos. Los resultados del experimento se muestran en la Figura 5. Concentraciones de creatina de hasta 10 µm son eficaces en reducir la viscosidad de la formulación en al menos 10 %. A 100 µm, la viscosidad de la formulación se reduce en 25 % relativo para formulaciones de control.

Ejemplo 7

Para probar los efectos de carnitina sobre las formulaciones farmacéuticas con una alta concentración de proteína, se probó una formulación a pH 5,0 que contenía 215 mg/mL de Anticuerpo A con carnitina 275 mM para sus efectos sobre la viscosidad. Primero, se formularon 70 mg/mL de Anticuerpo A en acetato sódico 10 mM 9 % de sacarosa a pH 5,20 y se dializó contra 4 litros de acetato de Na 10 mM a pH 5,20. Se llevó a cabo la diálisis a 4 °C durante la noche usando un tubo de diálisis plisado en piel de serpiente de 10.000 MWCO. A continuación, se filtró el Anticuerpo A a través de un filtro de acetato de celulosa 0,22 µm. Se concentró la proteína sometiendo a centrifugación con filtro de celulosa regenerada Amicon Ultra (100.000 MWCO) a 3500 rpm durante 2-3 horas a 20 °C. Se recogió la proteína del filtro en tubos Falcon de 15 mL y se mezcló por inversión. Se mezclaron miel microlitros de Anticuerpo A concentrado con L-carnitina sólida y sacarosa. La concentración final de L-carnitina y sacarosa fue L-carnitina 275 mM y sacarosa 275 mM. Se agitó con vórtex la mezcla hasta que la L-carnitina y sacarosa se disolvieron completamente. Se agitó con vórtex la mezcla durante 10 segundos y entonces se dejó que las muestras se asentaran durante 1 hora al menos (para equilibrar hasta temperatura ambiente y desgasificar burbujas). Se encendió un reómetro Brookfield RV-DVIII y se estabilizó la temperatura a 25 °C con un baño de temperatura circulante. Se pipetearon quinientos microlitos de muestra en el reómetro y se ajustaron las rpm para conseguir el porcentaje de valores de par de fuerzas entre 10-80 %. Se dejó que las muestras se estabilizaran en ese intervalo y se recogieron puntos de datos. La Figura 6 muestra que la disminución en la viscosidad de la formulación fue 10 % con respecto al control sin excipiente, pero 35 % con respecto a otras formulaciones isotónicas que contenían un excipiente diferente tal como sacarosa.

Ejemplo 8

Se evaluó el efecto de la creatina sobre la estabilidad de proteína por su adición a formulaciones de proteína en concentraciones de hasta 55 mM. Se dializó masa de anticuerpo A (70 mg/mL) en acetato sódico 10 mM 9 % de sacarosa a pH 5,20 contra acetato sódico 10 mM pH 5,00 durante la noche a 4 °C. Entonces se concentró por centrifugación la proteína dializada usando concentradores centrifugos de 10.000 MWCO Amicon Ultra a 3.000 rpm usando una centrífuga Beckman Coulter Allegra X12-R. Entonces se diluyó el Anticuerpo A concentrado (230 mg/mL) hasta 100 mg/mL en acetato sódico 10 mM, acetato sódico 10 mM que contenía 10 % de sorbitol, o acetato sódico 10 mM que contenía creatina 100 mM para alcanzar las concentraciones finales de excipiente. Se esterilizaron por filtración las muestras y se envasaron en viales de vidrio de 3 cm³ en una campana estéril. Se almacenaron las muestras durante 8 días en una estufa de incubación de 52 °C antes del análisis por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-HPLC). La Figura 7 muestra el efecto de la creatina sobre la reducción en la agregación de anticuerpo durante la incubación durante ocho días a 52 °C. A 52 °C, la creatina 55 mM es más eficaz en prevenir la agregación de Anticuerpo A (100 mg/mL) que 5 % de sorbitol, otro excipiente.

Ejemplo 9

Ensayo de los efectos de combinaciones de creatina-poliol sobre la agregación térmicamente inducida de Anticuerpo A. Se probaron las combinaciones de creatina y o sacarosa o sorbitol para la capacidad de reducir la agregación de Anticuerpo A (150 mg/mL) después de dos semanas a 52 °C. Se dializó el Anticuerpo A (200 mg/mL) en acetato sódico 20 mM pH 5,00 en acetato sódico 20 mM pH 5,00 que contenía sorbitol 250 mM, sacarosa 250 mM, creatina 50 mM, sorbitol 200 mM + creatina 50 mM y sacarosa 200 mM + creatina 50 mM. Tras la diálisis durante la noche,

se comprobó la concentración de Anticuerpo A midiendo la absorbancia a 280 nM usando un espectrofotómetro de UV-Vis. Se ajustaron las concentraciones de cada formulación hasta 150 mg/mL añadiendo el tampón de formulación correspondiente para cada muestra. Se esterilizaron por filtración las muestras y se envasaron en viales de vidrio de 3 cm³ en una campana estéril. Se almacenaron las muestras durante 2 semanas en una estufa de calefacción a 52 °C antes del análisis por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-HPLC). Los resultados del experimento se muestran en la Figura 8, y demuestran que la combinación de creatina con o sorbitol o sacarosa conduce a una mayor reducción en la agregación de Anticuerpo A con cualquiera de los excipientes solos. El usar sacarosa 200 mM más creatina 50 mM da una reducción aproximada de 2 veces en el porcentaje de agregación de la formulación de anticuerpo después de dos semanas a 52 °C.

10 Ejemplo 10 (para referencia)

Se probó el efecto de la concentración de creatina sobre la agregación de anticuerpos IgG₂ (30 mg/mL) a 52 °C durante una semana usando un anticuerpo anti-estreptavidina. Se dializó MAb IgG₂ anti-estreptavidina (30 mg/mL) en acetato sódico 20 mM, 5 % de sorbitol a pH 5,00 contra acetato sódico 20 mM a pH 5,00 durante la noche a 4 °C. Entonces se concentró la proteína dializada hasta 60 mg/mL por centrifugación usando concentradores centrífugos de 10.000 MWCO Amicon Ultra a 3.000 rpm usando una centrifugadora Beckman Coulter Allegra X12-R. Entonces se diluyeron las muestras hasta 30 mg/mL usando diferentes relaciones de acetato sódico 20 mM pH 5,00 y acetato sódico 20 mM a pH 5,00 que contenía creatina 100 mM. Se esterilizaron por filtración las muestras y se envasaron en viales de vidrio de 3 cm³ en una campana estéril. Se almacenaron las muestras durante 1 semana en una estufa de calefacción a 52 °C antes del análisis por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-HPLC). Los resultados en la Figura 9 muestran el efecto de la creatina sobre la reducción en la agregación de anti-estreptavidina. La concentración de creatina parece tener un efecto lineal sobre la reducción de la agregación de anticuerpos desde creatina 0 mM hasta 50 mM. Tan solo la creatina 1 mM tiene un efecto detectable sobre la agregación de anticuerpo.

Ejemplo 11

Se probó el efecto de la concentración de L-carnitina sobre la reducción de la agregación térmicamente inducida de Anticuerpo A. Se dializó una masa de Anticuerpo A (70 mg/mL) en acetato sódico 10 mM 9 % de sacarosa a pH 5,20 contra acetato sódico 10 mM a pH 5,00 durante la noche a 4 °C. Entonces se concentró la proteína dializada por centrifugación usando concentradores centrífugos de 10.000 MWCO Amicon Ultra a 3.000 rpm usando una centrifugadora Beckman Coulter Allegra X12-R. Entonces se diluyó el Anticuerpo A concentrado (230 mg/mL) hasta 100 mg/mL de relaciones variables de acetato sódico 10 mM a pH 5,00 y acetato sódico 10 mM a pH 5,00 que contenía L-carnitina 500 mM. Se esterilizaron por filtración las muestras y se envasaron en viales de vidrio de 3 cm³ en una campana estéril. Se almacenaron las muestras durante 4 días en una estufa de calefacción a 52 °C antes del análisis por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-HPLC). La Figura 10 muestra el efecto de las concentraciones crecientes de L-carnitina sobre la agregación de una disolución de 100 mg/mL de Anticuerpo A, después de mantener la formulación a 52 °C durante cuatro días. Los datos muestran que las concentraciones crecientes de L-carnitina tienen un efecto lineal sobre la reducción en los agregados de alto peso molecular. También hubo una reducción en la formación de dímero, pero el efecto sobre los agregados de alto peso molecular fue mucho más pronunciado.

Ejemplo 12

Se probó el efecto de una formulación tamponada con L-carnitina sobre la agregación térmicamente inducida de Anticuerpo B, un anticuerpo IgG₂. Se dializó masa de Anticuerpo B (70 mg/mL) en acetato sódico 10 mM 5 % sorbitol a pH 5,00 en agua desionizada por encima de 4 °C. Se diluyó la disolución de anticuerpo resultante diez veces hasta 7 mg/mL en o acetato sódico 10 mM a pH 4,50 o L-carnitina 10 mM a pH 4,50. Se confirmó el pH de cada muestra usando un pH-metro. Se esterilizaron por filtración las muestras y se envasaron en viales de vidrio de 3 cm³ en una campana estéril. Se almacenaron las muestras durante 4 semanas en una estufa de calefacción a 52 °C antes del análisis por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-HPLC). Debido a que la L-carnitina tiene un grupo ácido carboxílico ionizable con una pKa de 3,8, puede funcionar como un tampón en formulaciones acuosas entre pH 2,8-4,8. El intervalo de pH desde 4-4,8 puede ser útil para anticuerpos y otras proteínas que son más estables a pH más bajo. Los resultados en la Figura 11 muestran que las formulaciones de anticuerpo tamponadas con L-carnitina en este intervalo de pH son menos propensas a la agregación que las formulaciones tamponadas con acetato, como se observa por una reducción de casi 4 veces en la agregación.

Ejemplo 13

Se muestran los efectos de la creatinina sobre la viscosidad de una formulación de anticuerpo IgG₂ humanizado en la Figura 12. Se dializaron las muestras durante la noche a 4 °C contra 4 litros de acetato sódico 10 mM a pH 5,20 que contenía o creatinina 275 mM o 9 % de sacarosa. Entonces se concentraron las muestras usando concentradores centrífugos de Amicon Ultra (100.000 MWCO) a 3500 rpm durante aproximadamente 5 horas a 20 °C. Se midieron las concentraciones de proteína por absorbancia UV a 280 nm usando disoluciones diluidas de proteína preparadas usando pipetas de desplazamiento positivo. Se ajustaron las concentraciones de proteína hasta 160 mg/mL diluyendo con el tampón de formulación apropiado. Se midió la viscosidad de las muestras usando un reómetro Brookfield RV-DVIII. Se pipetearon quinientos microlitos de muestra en el reómetro y se ajustaron las rpm

para conseguir el porcentaje de valores de par de fuerzas entre 10-80 %. Se dejó que las muestras se estabilizaran en ese intervalo y se recogieron puntos de datos. Los resultados mostrados en la Figura 12 muestran que la muestra que contiene creatinina 275 mM es más de 80 % menos viscosa que la muestra que contiene 9 % de sacarosa.

Listado de secuencias

5 <110> Amgen Inc. Sloey, et al.

<120> Formulaciones farmacéuticas

<130> 01017/43031A

10 <150> US 60/975.780

< 151> 27-09-2007

<160> 2

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 193

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> péptido_mad

25 <222> (28)..(192)

<400> 1

ES 2 750 254 T3

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 -25 -20 -15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 -10 -5 -1 1 5

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 10 15 20

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 25 30 35

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 40 45 50

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 55 60 65

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 70 75 80 85

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 90 95 100

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 105 110 115

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 120 125 130

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 135 140 145

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 150 155 160 165

Arg

<210> 2

5 <211> 193

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

10 <221> péptido_mad

<222> (28)..(192)

<400> 2

ES 2 750 254 T3

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 -25 -20 -15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 -10 -5 -1 1 5

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 10 15 20

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Asn Glu Thr Cys Ser Leu Asn Glu
 25 30 35

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 40 45 50

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 55 60 65

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 70 75 80 85

Gln Val Asn Glu Thr Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 90 95 100

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 105 110 115

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 120 125 130

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 135 140 145

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 150 155 160 165

Arg

REIVINDICACIONES

1. Uso de un excipiente seleccionado del grupo que consiste en creatina, creatinina, carnitina y mezclas de las mismas para reducir la viscosidad de una disolución farmacéutica líquida acuosa adecuada para administración parenteral,
- 5 comprendiendo dicha disolución una proteína terapéutica a una concentración de al menos 70 mg/mL.
2. El uso de la reivindicación 1, en donde viscosidad de la disolución se reduce en al menos 10 % o al menos 30 %.
3. Una disolución farmacéutica líquida adecuada para administración parenteral que comprende una proteína terapéutica a una concentración de al menos 70 mg/mL, y un excipiente seleccionado del grupo que consiste en creatina, creatinina, carnitina y mezclas de las mismas.
- 10 4. Una disolución farmacéutica líquida de la reivindicación 3, en donde
- (a) el excipiente es creatina, creatinina o una mezcla de las mismas, y la concentración de creatina/creatinina es desde 0,002 mM hasta 750 mM o desde 0,01 mM hasta 50 mM; o
- (b) el excipiente es carnitina a una concentración entre 1 mM y 3 M o entre 5 mM y 300 mM.
- 15 5. Una disolución farmacéutica líquida de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 que tiene un pH entre 4,0 y 6,0 o de 5,0 a 5,5.
6. Un método de preparación de un polvo liofilizado que comprende la etapa de liofilizar una disolución farmacéutica líquida de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5.
7. Un método de reconstitución de un polvo liofilizado, que comprende la etapa de añadir un diluyente acuoso estéril a dicho polvo, en donde dicho polvo liofilizado comprende una proteína terapéutica y un excipiente seleccionado del grupo que consiste en creatina, creatinina, carnitina y mezclas de las mismas, y en donde dicho método produce una disolución farmacéutica líquida acuosa según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5.
- 20 8. Un método de la reivindicación 7, en donde
- (a) el excipiente es creatina, creatinina o una mezcla de las mismas, presente a una concentración de creatina/creatinina entre 4 ng por mg de proteína terapéutica y 1,25 mg por mg de proteína terapéutica; o
- 25 (b) el excipiente es carnitina a una concentración entre 2 µg y 7 mg por mg de proteína terapéutica.
9. El uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la proteína terapéutica es un anticuerpo.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde la proteína terapéutica es un anticuerpo.
11. Una disolución farmacéutica líquida de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde la proteína terapéutica es un anticuerpo.
- 30 12. Un polvo liofilizado obtenible por el método de la reivindicación 6, que comprende un anticuerpo terapéutico y un excipiente seleccionado del grupo que consiste en creatina, creatinina, carnitina y mezclas de las mismas, en donde con la reconstitución con un diluyente acuoso la disolución resultante presenta viscosidad reducida con respecto a un control sin excipiente y en donde dicha disolución acuosa reconstituida es adecuada para administración parenteral.
- 35 13. Una disolución farmacéutica líquida de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 y 11 para su uso en un método de terapia o profilaxis de un trastorno tratable por la proteína terapéutica, en donde la disolución se administra por vía parenteral.
14. Una disolución farmacéutica líquida para su uso según la reivindicación 13, en donde la disolución se administra por vía subcutánea.

40

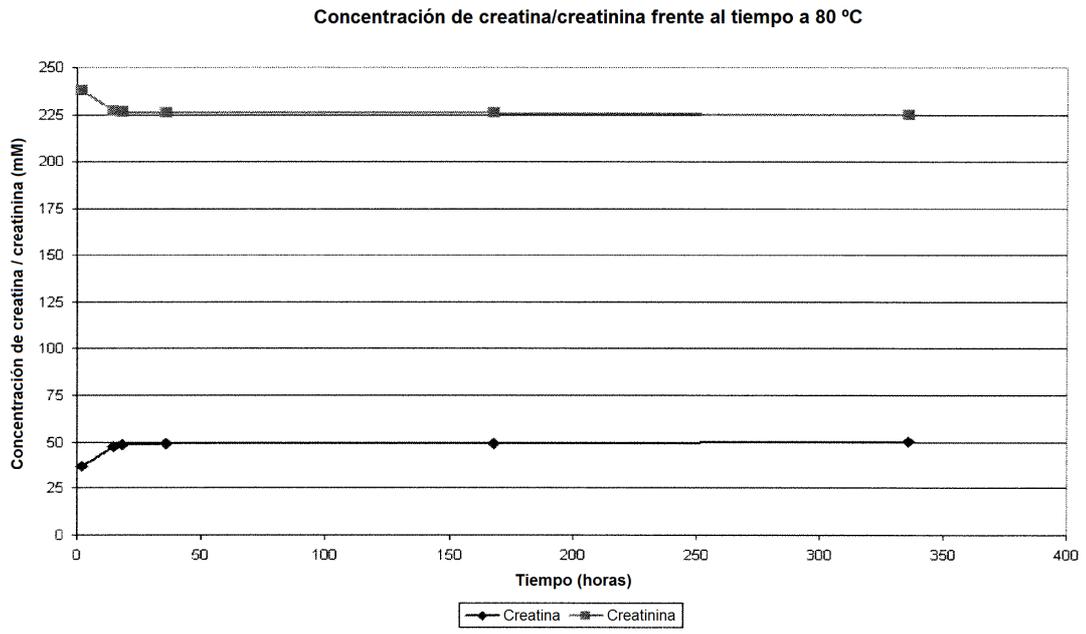


Figura 1.

ES 2 750 254 T3

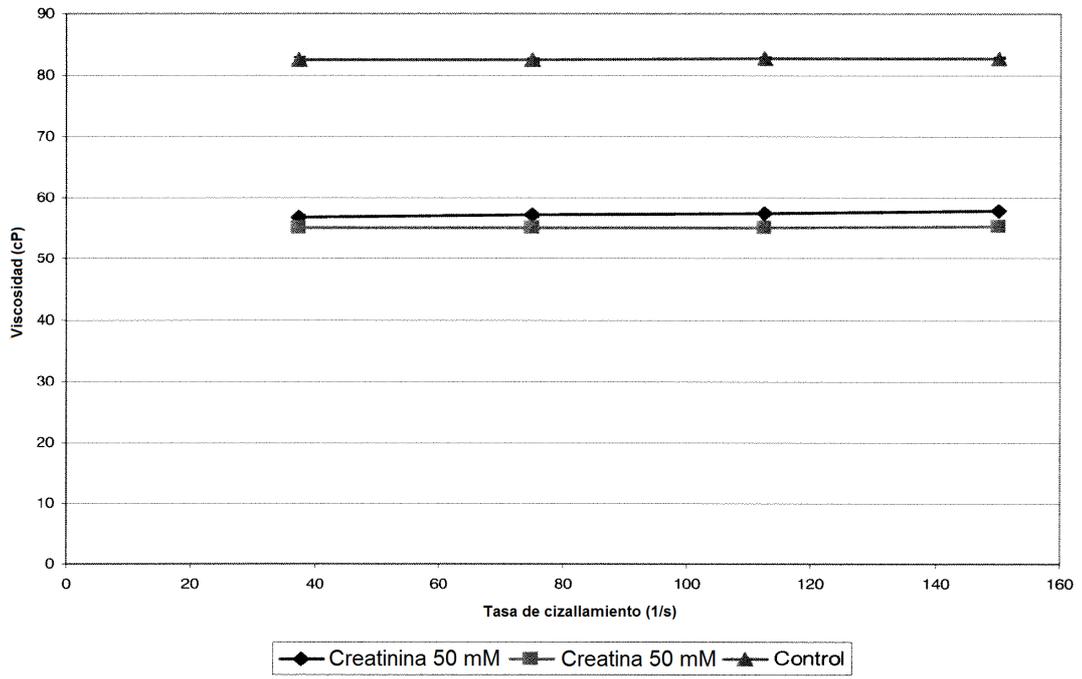


Figura 2.

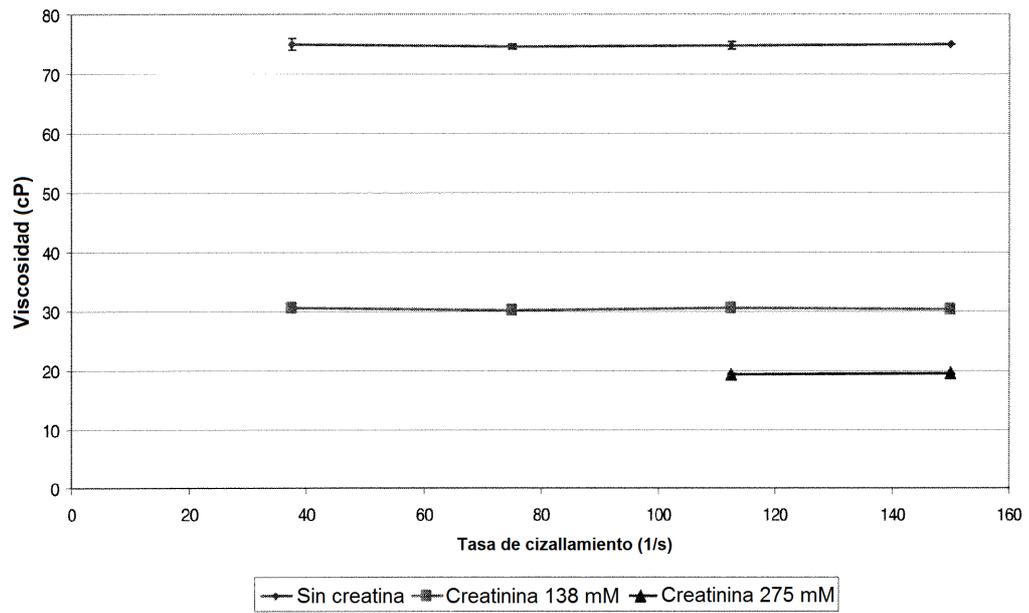


Figura 3.

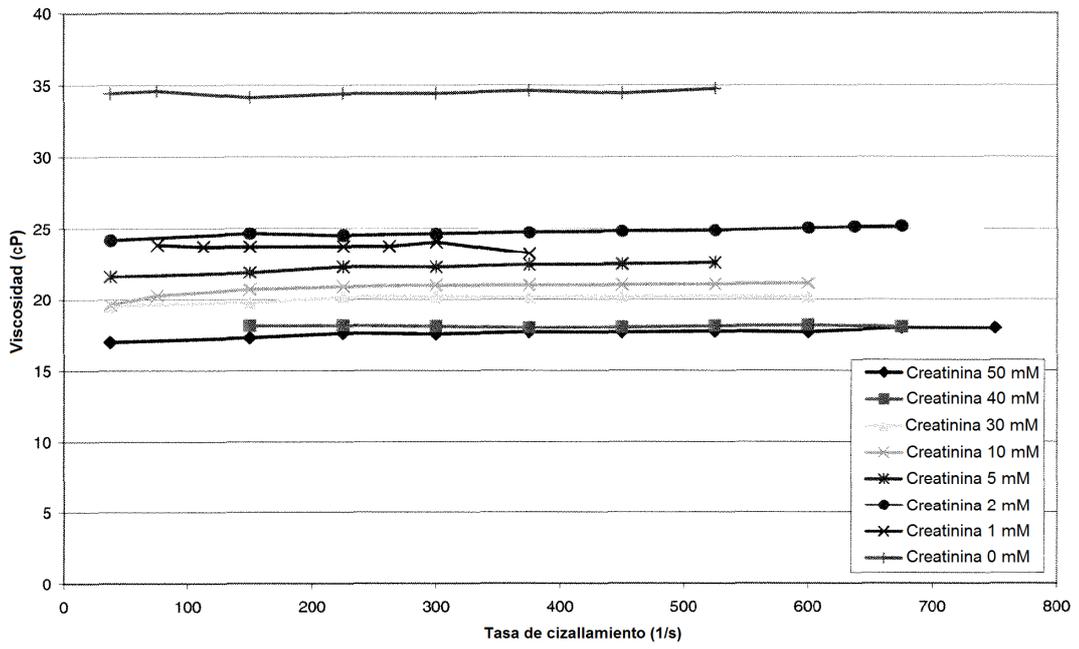


Figura 4.

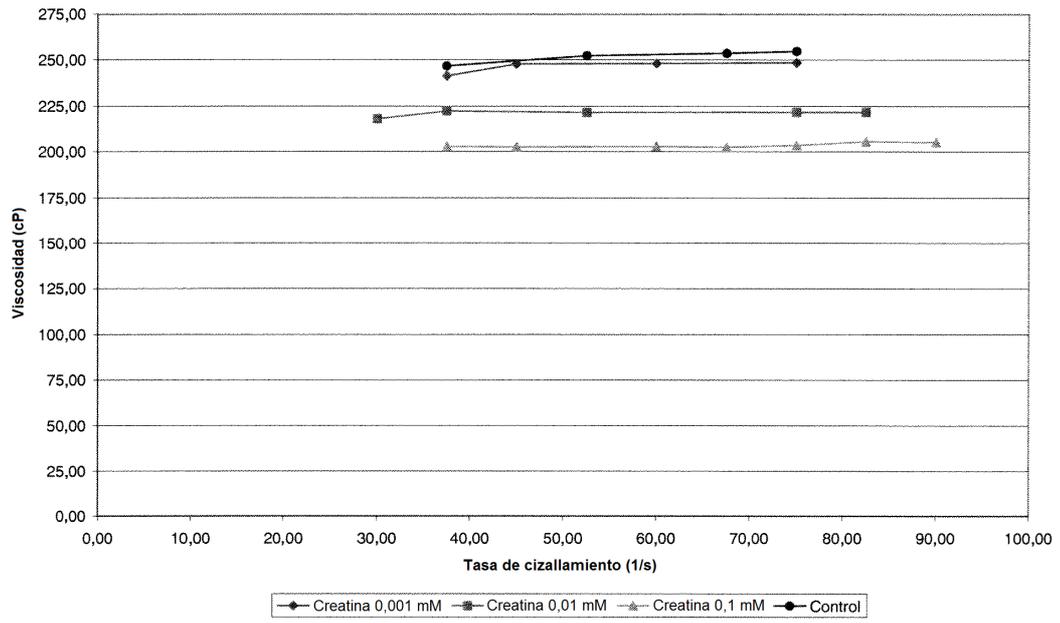


Figura 5.

ES 2 750 254 T3

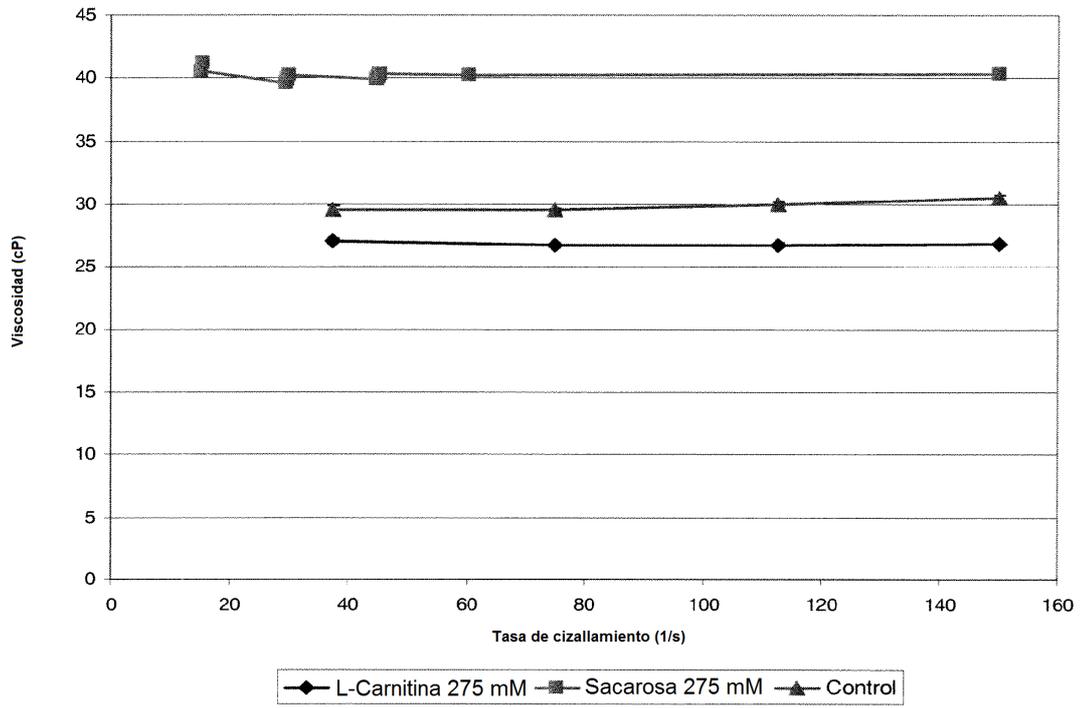


Figura 6.

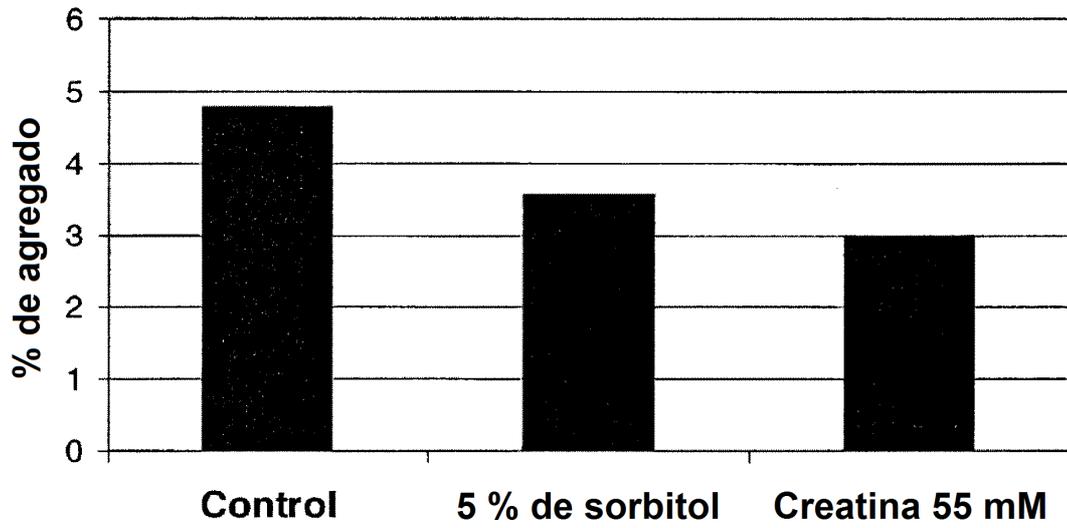


Figura 7.

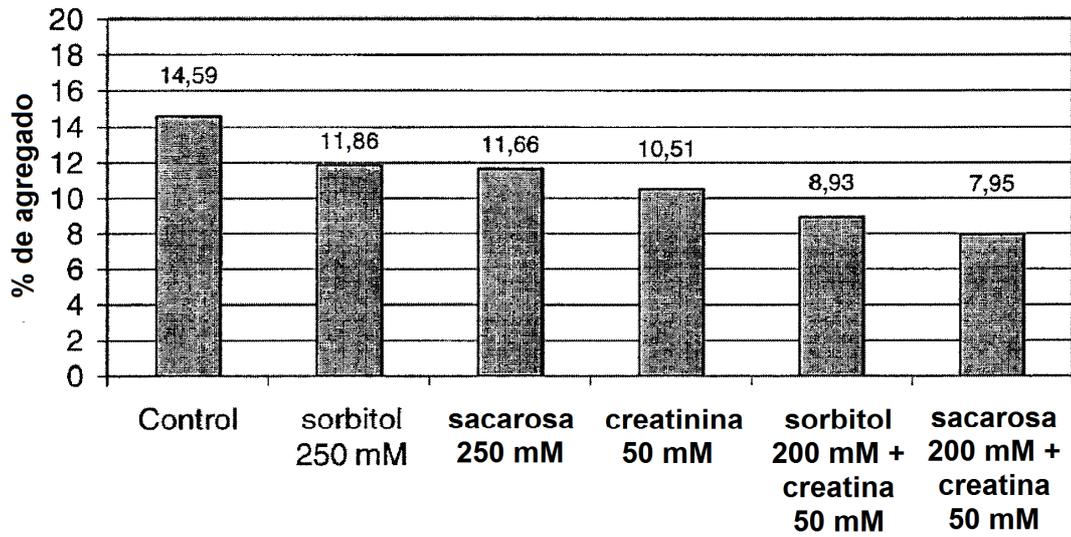


Figura 8.

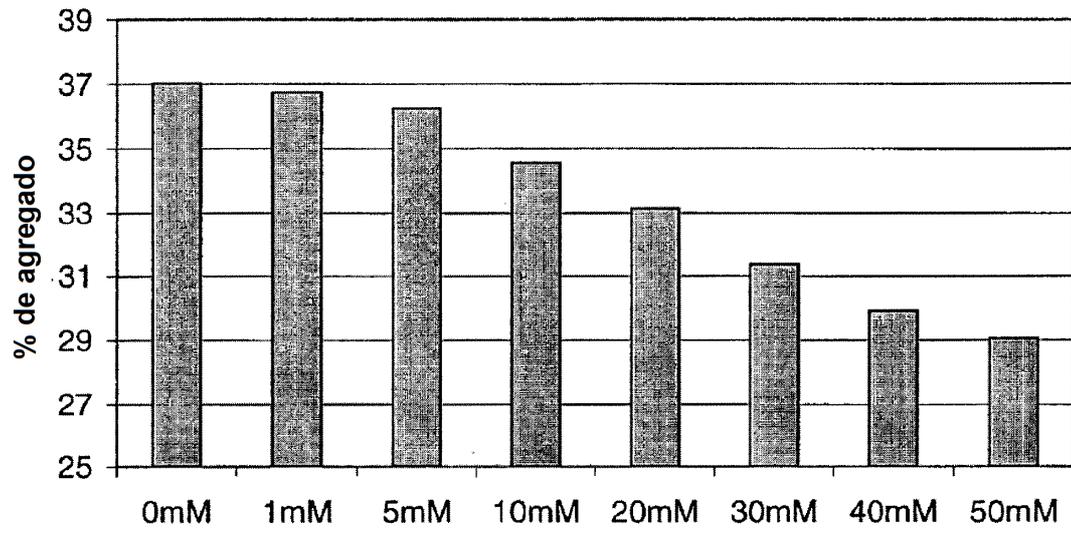


Figura 9.

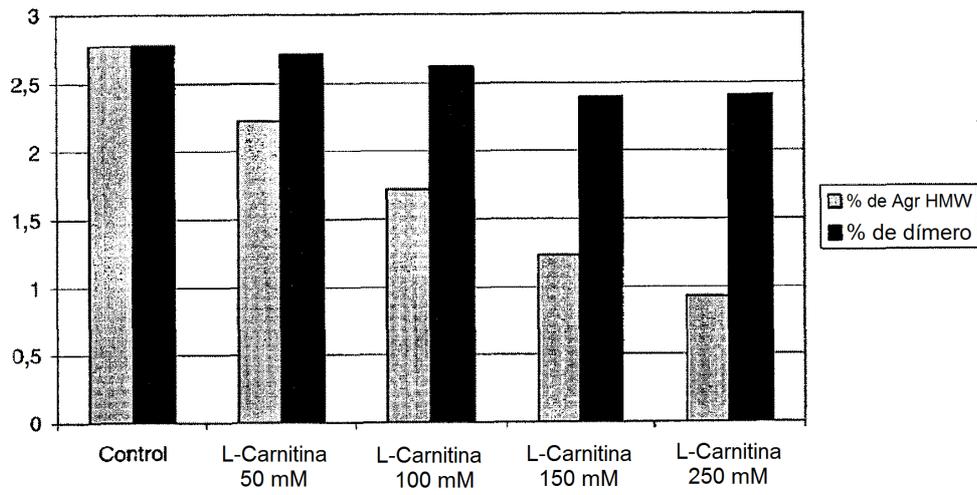


Figura 10.

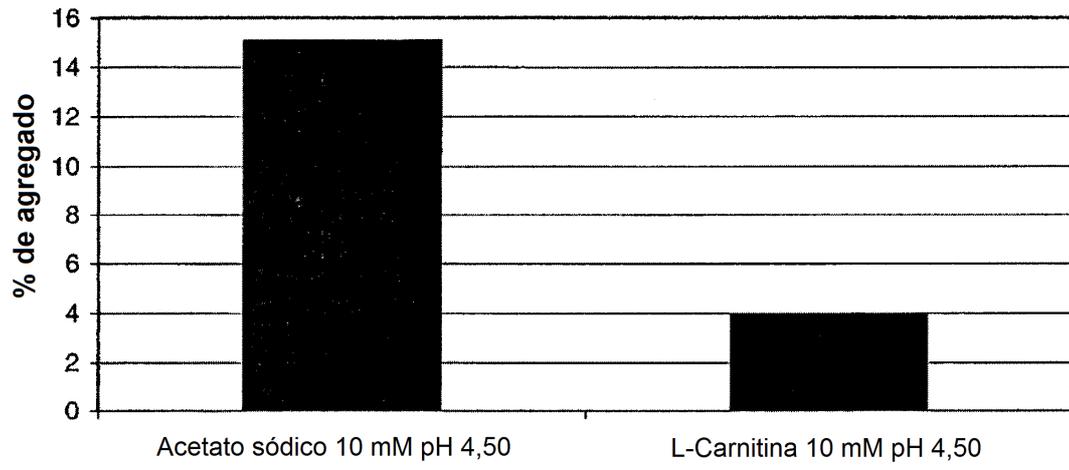


Figura 11.

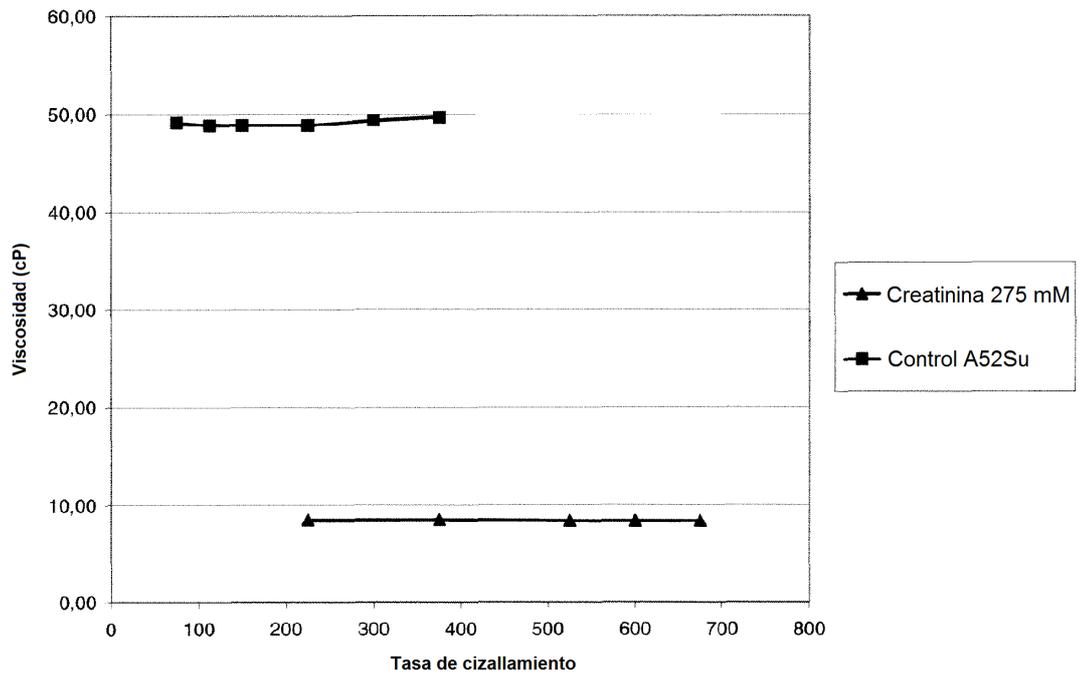


Figura 12.