

FORMULACIÓN DE PROTEÍNA DE FUSIÓN CTLA4-Ig

CAMPO DE LA INVENCION

5 [0001] La presente invención está relacionada con la formulación estable de una molécula de proteína de fusión. En particular, la invención divulga una formulación de proteína de fusión estable de proteína 4-inmunoglobulina (CTLA4-Ig) asociada a linfocitos T citotóxicos, en donde la formulación comprende sistemas reguladores y estabilizadores.

ANTECEDENTES

[0002] Durante las últimas dos décadas, la tecnología del ADN recombinante ha llevado a la comercialización de muchas proteínas, en particular, terapias de anticuerpos y moléculas de proteínas de fusión.

10 [0003] Las proteínas de fusión, en particular, las moléculas de proteína de fusión Fc (en las que la porción Fc de la inmunoglobulina (Ig) humana se conjuga con una porción particular de un receptor) están ganando importancia debido a su amplio uso en el tratamiento de diversos trastornos oncológicos e inmunológicos. El Etanercept (TNFR-IgFc), aflibercept (VEGFR-IgFc) y abatacept y belatacept (CTLA4-IgFc) se encuentran entre las proteínas de fusión Fc aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA) para tratar diversos trastornos. La eficacia de la molécula de proteína de fusión depende principalmente de la estabilidad, la ruta de administración y sus formas de dosificación y concentraciones. Esto, a su vez, requiere que estas moléculas de proteína se formen de manera apropiada para retener la estabilidad y la actividad.

20 [0004] Las proteínas en general, y las proteínas de fusión Fc en particular, son típicamente inestables en solución y sensibles al pH, temperatura y oxidación y, por tanto, pueden sufrir una variedad de reacciones covalentes y no covalentes, modificaciones o degradaciones en solución. Las vías de degradación de proteínas más comunes incluyen agregación, desamidación y/u oxidación y se sabe que estas vías de degradación están influenciadas por el pH, la temperatura y las condiciones de almacenamiento, incluidas las condiciones de formulación y excipientes. Por tanto, estas vías conducen a la inestabilidad física y química de una proteína en solución.

25 [0005] La agregación en proteínas terapéuticas es de particular interés, porque a menudo da como resultado una disminución de la bioactividad/pérdida de actividad durante un período de tiempo y puede ser inmunogénica cuando se administra a un paciente. En el caso de proteínas de fusión, la agregación es significativa ya que implican la fusión de dos o más proteínas, tienen una estructura grande y compleja y tienden a formar agregados a una velocidad rápida en comparación con polipéptidos o anticuerpos simples.

30 [0006] Aparte de la agregación, otro tipo de inestabilidad de una proteína multimérica, que ocurre específicamente en las regiones donde se fusionan dos o más proteínas, es la fragmentación/recorte que puede ser el resultado de desamidación, oxidación, isomerización y/o hidrólisis. La desamidación puede ocurrir en los residuos de asparagina o glutamina, dando como resultado una variante/s de carga de la proteína. La oxidación de las proteínas de fusión involucra principalmente residuos de metionina y generalmente está influenciada por factores externos como la exposición a la luz y los iones de metales de transición o el producto de degradación de un excipiente (por ejemplo, peróxido de hidrógeno de la degradación del polisorbato). Se sabe que la presencia de estos productos oxidados y variantes de carga en una molécula de proteína terapéutica aumenta la inestabilidad y, por lo tanto, disminuye la bioactividad de la proteína.

40 [0007] Por lo tanto, es esencial desarrollar una mezcla adecuada de componentes de formulación que estabilizaría una molécula de proteína terapéutica (de fusión) frente a los muchos factores que inducen inestabilidad física y química. Además, la formulación desarrollada debe mantener la estabilidad coloidal durante las condiciones de almacenamiento, ya que mide y asegura que las moléculas de proteína permanezcan suspendidas en una solución acuosa en equilibrio.

45 [0008] Existen numerosas clases de excipientes tales como azúcares y alcoholes de azúcar, aminoácidos y tensioactivos que se utilizan para estabilizar proteínas y moléculas de proteínas de fusión. Sin embargo, la elección de los excipientes al formular una proteína se rige por varios otros factores, como su compatibilidad con la proteína y otros componentes de la formulación, el modo (previsto) de administración y la dosificación de la proteína terapéutica, etc. Por lo tanto, el desafío detrás del desarrollo de una formulación implica el cribado y la selección de condiciones de regulador y excipientes adecuados, incluidas sus concentraciones, para lograr una formulación estable. Además, también se espera que la formulación desarrollada sea estable a temperatura ambiente y sea adecuada para administrarse en forma liofilizada o líquida.

RESUMEN

55 [0009] La presente invención divulga una formulación farmacéutica estable de una molécula de proteína de fusión que comprende regulador, poliol, aminoácido y tensioactivo, en donde la proteína de fusión es una molécula de CTLA4-Ig.

[0010] En particular, la invención divulga una formulación farmacéutica estable de proteína de fusión CTLA4-Ig que comprende regulador, poliol, aminoácido y tensioactivo en donde dicha formulación carece de sacarosa.

[0011] Las formulaciones estables descritas anteriormente de la proteína de fusión CTLA4-Ig pueden, opcionalmente, estar libres de cloruro de sodio.

5 [0012] Además, la invención divulga un método para reducir la agregación y/o fragmentación de la proteína de fusión CTLA4-Ig en una formulación que comprende la adición de histidina y poliol.

10 [0013] La invención también describe un método para aumentar la estabilidad de la formulación de proteína de fusión CTLA4-Ig, que comprende histidina y manitol, en donde los componentes de histidina y manitol también se agregan durante la etapa del proceso, en particular en la etapa del proceso de filtración de flujo tangencial (una etapa antes del paso de formulación). Tal adición durante el proceso imparte una estabilidad significativa a la formulación.

15 [0014] La proteína de fusión CTLA4-Ig descrita en dicha formulación es estable tanto a concentraciones más bajas como a más altas (de 10 mg/ml a 200 mg/ml) y a diversas temperaturas, incluso a 30 °C durante al menos dos semanas. Dicha formulación contiene menos de aproximadamente el 10 % de las moléculas de proteína de fusión en forma agregada y preferiblemente menos del 7.5 % de las moléculas de proteína de fusión en forma agregada.

[0015] Además, la combinación de poliol y aminoácido imparte estabilidad coloidal a la molécula de proteína de fusión presente en la formulación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

20 [0016] El término "proteína de fusión" significa una proteína formada mediante fusión (es decir, uniendo) todo o parte de dos polipéptidos que no son iguales. Normalmente, las proteínas de fusión se elaboran utilizando técnicas de ADN recombinante, mediante la unión de un extremo a otro de los polinucleótidos que codifican los dos polipéptidos.

25 [0017] Los términos "CTLA4-Ig" o "molécula CTLA4-Ig" o "molécula CTLA4Ig" se usan indistintamente y se refieren a una molécula de proteína que comprende un polipéptido que tiene un dominio extracelular CTLA4 o una porción del mismo, y una región constante de inmunoglobulina o una parte del mismo. El dominio extracelular y la región constante de inmunoglobulina pueden ser de tipo salvaje, mutante o modificado, y de mamífero, incluidos humanos o ratones. El polipéptido puede comprender además dominios proteicos adicionales. Una molécula de CTLA4-Ig también puede referirse a formas multiméricas del polipéptido, como dímeros, tetrámeros y hexámeros.
30 Una molécula de CTLA4-Ig también es capaz de unirse a CD80 y/o CD86.

[0018] El término formulación "estable" se refiere a la formulación en donde el anticuerpo que contiene conserva su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica, tras el almacenamiento.

35 [0019] Los estudios de estabilidad proporcionan evidencia de la calidad de un anticuerpo bajo la influencia de diversos factores ambientales durante el transcurso del tiempo. La "Q1A: Prueba de Estabilidad de Nuevos Productos y Sustancias Farmacológicas" de ICH establece que los datos de los estudios de estabilidad acelerada se pueden utilizar para evaluar el efecto de las variaciones a corto plazo superiores o inferiores a las condiciones de almacenamiento en la etiqueta que pueden ocurrir durante el envío de los anticuerpos.

40 [0020] Se encuentran disponibles diversos métodos analíticos para medir la degradación física y química de la proteína de fusión en las formulaciones farmacéuticas. Una proteína de fusión "retiene su estabilidad física" en una formulación farmacéutica si sustancialmente no muestra signos de agregación, precipitación y/o desnaturalización tras el examen visual de color y/o claridad, o medido por dispersión de luz UV o cromatografía de exclusión por tamaño. Se dice que una proteína de fusión "retiene su estabilidad química" en una formulación farmacéutica cuando muestra una formación mínima o nula de variantes de producto que pueden incluir variantes como resultado de la modificación química de la proteína de fusión, como desaminación, oxidación, etc. Métodos
45 analíticos como la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía iónica hidrófoba pueden utilizarse para investigar las variantes de productos químicos.

50 [0021] Las especies de monómero, dímero y de alto peso molecular (HMW) de la molécula CTLA4Ig pueden separarse mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). La SEC separa moléculas en función del tamaño molecular. La separación se logra mediante la exclusión o inclusión molecular diferencial a medida que las moléculas migran a lo largo de la columna. Por tanto, la resolución aumenta en función de la longitud de la columna. Para mantener la actividad apropiada de una proteína de fusión, es deseable reducir la formación de agregados o fragmentación (monómero/especies de bajo peso molecular) de productos y, por tanto, controlar el

contenido de dímeros a un valor objetivo. El dímero es la forma principal presente en las proteínas de fusión y eluye como pico principal en la cromatografía de exclusión por tamaño. Las muestras de moléculas de CTLA4lg pueden separarse utilizando un HPLC Alliance 2695 (Waters, Milford, Mass.) equipado con columnas TSK Gel® G3000SWXL (300 mm×7.8 mm) y TSK Gel® G3000SWXL (40 mm×6.0 mm) (Tosoh Bioscience, Montgomery, Pa.).

[0022] La estabilidad coloidal de una proteína proporciona información sobre la interacción de las moléculas de las proteínas dentro de sí mismas, y entre las moléculas circundantes, en un entorno acuoso. Un indicador o predictor común de la estabilidad coloidal de una molécula de proteína en una solución es el valor del coeficiente de difusión (k_D), medido mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS). Cuanto mayor sea el valor del coeficiente de difusión, mayores serán las fuerzas de repulsión, más solubilidad y menos formación de agregados en la molécula de proteína y, por lo tanto, la proteína presenta estabilidad coloidal. Y la estabilidad coloidal es un indicador de la solubilidad de las proteínas, la viscosidad, el tipo de agregados de proteínas, etc.

[0023] Los excipientes farmacéuticamente aceptables se refieren a los aditivos o vehículos que pueden contribuir a la estabilidad del anticuerpo en la formulación. Los excipientes pueden incluir estabilizadores y modificadores de tonicidad. Ejemplos de estabilizadores y modificadores de la tonicidad incluyen, pero no se limitan a, azúcares, sales, tensioactivos y derivados y combinaciones de los mismos.

[0024] Los pasos de preformulación se refieren a cualquiera o múltiples pasos realizados antes de formular la proteína en un producto terapéutico. Ejemplos de tales pasos incluyen cromatografía, filtración (ultrafiltración, filtración estéril, nanofiltración, diafiltración, filtración profunda) o cualquier otro paso realizado para concentrar la proteína o intercambiar el regulador por un regulador diferente/adecuado. Las etapas de filtración mencionadas en este documento se pueden realizar en un modo de filtración de flujo tangencial.

[0025] El término "poliol" o "alcohol de azúcar" como se usa en este documento incluye un compuesto orgánico que contiene múltiples grupos hidroxilo. Ejemplos de polioles incluyen manitol, sorbitol, xilitol, etc.

[0026] Tensioactivo se refiere a excipientes farmacéuticamente aceptables usados para proteger las formulaciones de proteínas contra diversas condiciones de estrés, como agitación, cizallamiento, exposición a altas temperaturas, etc. Los tensioactivos adecuados incluyen, entre otros, ésteres de ácidos grasos polioxietilensorbitán tales como Tween 20™ o Tween 80™, copolímero de polioxietileno-polioxipropileno (por ejemplo, Poloxamer, Pluronic), dodecil sulfato de sodio (DSS) y similares o combinaciones de los mismos.

[0027] Ejemplos de sales incluyen, pero sin limitación, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, tiocianato de sodio, tiocianato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de amonio, cloruro de calcio, cloruro de zinc y/o acetato de sodio.

[0028] Ciertos aspectos y realizaciones específicos de la invención se describen más completamente con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención de ninguna manera.

Descripción detallada de las realizaciones

[0029] Muchas de las formulaciones de proteínas de fusión aprobadas contienen sacarosa como estabilizador. Sin embargo, la presente invención divulga una formulación de proteína de fusión (CTLA4-Ig) que proporciona estabilidad sin la presencia de sacarosa.

[0030] La presente invención divulga una formulación farmacéutica estable de una proteína de fusión que comprende regulador, poliol, aminoácido y tensioactivo.

[0031] En una realización, la invención divulga una formulación farmacéutica estable de una proteína de fusión CTLA4-Ig que comprende regulador, poliol, aminoácido y tensioactivo, y en donde la formulación está desprovista de sacarosa.

[0032] En una realización, la invención divulga una formulación farmacéutica estable de una proteína de fusión CTLA4-Ig que comprende regulador, manitol, histidina y tensioactivo, y en donde la formulación carece de sacarosa.

[0033] En cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente, la proporción de proteína de fusión CTLA4-Ig a poliol es 1:0.7 o menos y la proporción de proteína de fusión CTLA4-Ig a aminoácido es 1:0.1 o menos.

[0034] En las realizaciones de la invención antes mencionadas, la formulación de proteína de fusión CTLA4-Ig tampoco requiere sal para estabilizar la formulación de proteína terapéutica.

- [0035] En las realizaciones mencionadas anteriormente, la formulación de la proteína de fusión CTLA4-Ig además estará libre de sal, en donde la sal es cloruro de sodio.
- [0036] En una realización, la invención divulga una formulación farmacéutica estable de una proteína de fusión CTLA4-Ig que consiste esencialmente en regulador, manitol, histidina y tensioactivo.
- 5 [0037] En las realizaciones mencionadas anteriormente, la concentración de poliol presente en la formulación es menos de aproximadamente 125 mg/ml, preferiblemente menos de aproximadamente 80 mg/ml, y la concentración de aminoácido presente en la formulación es menos de aproximadamente 20 mg/ml, preferiblemente menos de 15 mg/ml y más preferiblemente 10 mg/ml.
- 10 [0038] En cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente, la concentración de proteína de fusión en la formulación es de aproximadamente 10 mg/ml a 200 mg/ml, preferiblemente de 20 mg/ml a 150 mg/ml, más preferiblemente de 25 mg/ml a 125 mg/ml.
- [0039] En cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente, la viscosidad de la formulación de proteína de fusión CTLA4-Ig es menos de 20 cp, preferiblemente menos de 10 cp, más preferiblemente menos de 5 cp.
- 15 [0040] En cualquiera de las realizaciones de la invención mencionadas anteriormente, el pH de la formulación de proteína de fusión CTLA4-Ig es de 6.0 a 8.0, preferiblemente de 6.5 a 7.5.
- [0041] En las realizaciones mencionadas anteriormente, el regulador mencionado en la formulación es regulador orgánico, regulador inorgánico y/o combinaciones de los mismos.
- [0042] En cualquiera de las formas de realización de la invención mencionadas anteriormente, dicho regulador orgánico es regulador citrato, regulador succinato o regulador acetato.
- 20 [0043] En otra realización más de la invención, el regulador inorgánico mencionado en la formulación es regulador de fosfato.
- [0044] En cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente, los aminoácidos incluyen aminoácidos básicos, aminoácidos hidrófobos y combinaciones de los mismos.
- 25 [0045] En una realización, la invención divulga una formulación farmacéutica estable de proteína de fusión CTLA4-Ig que comprende regulador de fosfato, manitol, histidina y tensioactivo.
- [0046] En una realización, la invención divulga una formulación farmacéutica estable que comprende molécula de proteína de fusión CTLA4-Ig, regulador citrato-fosfato, manitol, histidina y poloxámero, y en donde la formulación es estable y mantiene al menos el 94 % de la molécula de proteína de fusión como pico principal, cuando se analiza mediante cromatografía de exclusión por tamaño.
- 30 [0047] En otra realización más, la invención divulga un método para reducir la agregación en la formulación de proteína de fusión CTLA4-Ig, que comprende la adición de histidina y manitol a la formulación, en donde el contenido agregado en la formulación es menos del 7.5 % de la proteína, tras el almacenamiento a 30 °C durante 2 semanas.
- 35 [0048] En una realización, la invención divulga un método para inhibir la fragmentación en la formulación de proteína de fusión CTLA4-Ig, que comprende la adición de histidina y manitol a la formulación, en donde el contenido de molécula fragmentada en la formulación es menos del 3 %, preferiblemente menos del 1 % y más preferiblemente menos del 0.5 % de la proteína, tras almacenamiento a 30 °C durante 2 semanas.
- [0049] En una realización, la invención divulga una formulación farmacéutica estable de molécula de proteína de fusión CTLA4-Ig que comprende 125 mg/ml de proteína de fusión CTLA4-Ig, regulador de fosfato, 75 mg/ml de manitol, 15 mg/ml de histidina y 8 mg/ml de poloxámero.
- 40 [0050] En una realización, la invención divulga una formulación farmacéutica estable de molécula de proteína de fusión CTLA4-Ig que comprende 125 mg/ml de proteína de fusión CTLA4-Ig, regulador de fosfato, 85 mg/ml de manitol, 10 mg/ml de histidina y 8 mg/ml de poloxámero.
- [0051] En otra realización, la invención divulga un método para mantener la estabilidad coloidal de la proteína de fusión CTLA4-Ig en una formulación, que comprende la adición de histidina y poliol a la formulación.
- 45 [0052] En otra realización, la invención divulga un método para reducir la oxidación de la proteína de fusión CTLA4-Ig en una formulación, que comprende la adición de histidina y poliol.

- [0053] En cualquiera de las realizaciones anteriores de la invención, la formulación es una formulación líquida/ acuosa estable y es adecuada y puede liofilizarse como polvos liofilizados. Además, la formulación liofilizada de la proteína de fusión CTLA4-Ig se puede reconstituir con el diluyente apropiado para lograr la formulación líquida adecuada para la administración.
- 5 [0054] En cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente, la proteína de fusión CTLA4-Ig es abatacept o belatacept.
- [0055] En cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente, el aminoácido presente en la formulación funciona como estabilizador y no forma parte de un agente regulador.
- 10 [0056] En otra realización, la invención divulga un método para aumentar la estabilidad de la formulación de proteína de fusión CTLA4-Ig que comprende regulador, poliol, histidina y tensioactivo, y en donde también se añaden histidina y poliol en la etapa del proceso de preformulación que se encuentra en el paso de filtración de flujo tangencial [realizado como ultrafiltración (UF) y diafiltración (DF) para concentración de producto e intercambio de regulador].
- 15 [0057] En otra realización, la invención divulga un método para aumentar la estabilidad de la composición de proteína de fusión CTLA4-Ig, en donde el método comprende la adición de histidina y manitol durante la etapa del proceso, en particular en la etapa de filtración de flujo tangencial. Se encuentra que la estabilidad de la molécula de proteína aumenta significativamente en la estabilidad térmica y coloidal, cuando se añaden componentes de histidina y manitol en la etapa de filtración de flujo tangencial, específicamente en la etapa de ultrafiltración y/o diafiltración.
- 20 [0058] En otra realización más, la invención divulga un método para aumentar la estabilidad de la proteína de fusión CTLA4-Ig que comprende etapas de expresión y purificación de la proteína de fusión CTLA4-Ig; seguidas de concentración y/o intercambio de regulador de la proteína por UF – DF-UF, en donde el regulador usado en cualquiera de los pasos de UF-DF-UF incluye histidina y manitol; y seguidas de la formulación de la proteína en un regulador que comprende histidina, manitol y tensioactivo; en donde la estabilidad de la proteína aumenta en comparación con la formulación de la proteína que fue procesada por etapas UF-DF-UF sin la inclusión de histidina y manitol en ninguno de sus reguladores.
- 25 [0059] En una realización, la invención divulga un método para preparar una formulación estable de proteína de fusión CTLA4-Ig de alta concentración que comprende;
- 30 a) obtención de la molécula de proteína de fusión CTLA4-Ig purificada a partir del paso cromatográfico
b) someter la proteína de fusión CTLA4-Ig obtenida en el paso a) a ultrafiltración [UF] para concentrar la proteína
c) someter la proteína de fusión CTLA4-Ig concentrada obtenida en el paso b) a diafiltración usando un regulador que comprende manitol e histidina y,
d) someter la molécula de proteína de fusión CTLA4-Ig del paso c) a una segunda ultrafiltración para
- 35 obtener una sustancia farmacológica de proteína de fusión CTLA4-Ig adicional y altamente concentrada en donde la concentración de la formulación obtenida en el paso d) es de hasta 200 mg/ml y se encuentra para ser estable según lo medido por los estudios de estabilidad estándar.
- 40 [0060] Se encuentra que la estabilidad de la molécula de proteína aumenta significativamente en la estabilidad térmica y coloidal cuando se añaden componentes de histidina y manitol en la etapa de filtración de flujo tangencial. Y la adición de histidina y manitol en el paso de UF o DF, da como resultado un producto estable con un %HMW consistentemente menor que 10, incluso después de haber sido sometido a estudios de estabilidad acelerados.
- 45 [0061] En la realización mencionada anteriormente, la sustancia farmacológica obtenida del proceso anterior es estable y el producto farmacológico preparado a partir de la sustancia farmacológica es estable en condiciones de estabilidad acelerada, en las que la concentración del producto farmacológico es de hasta 140 mg/ml, preferiblemente 130 mg/ml. La adición de histidina y azúcar durante el paso DF del proceso TFF ayuda a lograr concentraciones más altas estables y solubles de la molécula de proteína de fusión CTLA4-Ig (hasta ~200 mg/ml) que a su vez ayuda en la preparación de la concentración deseada del producto farmacéutico a escala comercial por técnica de dilución simple. Esto, además, ahorra tiempo y recursos.
- 50 [0062] En las realizaciones mencionadas anteriormente, donde también se añaden histidina y poliol a la etapa del proceso de preformulación de UF o DF, la proteína formulada contiene menos del 10 % de la proteína en forma agregada, incluso cuando se almacena a 30 °C durante al menos dos semanas.
- 55 [0063] Las formulaciones de proteínas de fusión descritas que contienen sólo aminoácidos (y sin azúcar ni poliol) no estabilizan la proteína. Mientras que la adición de manitol a la formulación que contiene aminoácidos presenta un efecto estabilizador. Además, el manitol permite el uso de una combinación de aminoácidos en la mezcla de formulación. Sin embargo, sorprendentemente, y por el contrario, la formulación de proteína de fusión basada en

sacarosa (CTLA4-Ig) no ejerce una estabilización superior a la del manitol y no favorece el uso de combinación de aminoácidos y en su lugar exhibe un efecto desestabilizador sobre la proteína.

[0064] La formulación descrita anteriormente de proteína de fusión CTLA4-Ig es una formulación líquida (acuosa) estable, que puede usarse para administración parenteral. La administración parenteral incluye la administración intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular o cualquier otra ruta de administración que generalmente se considere que cae dentro del alcance de la administración parenteral y como es bien conocido por un experto.

[0065] Las formulaciones descritas de la invención usan excipientes mínimos y en cantidades menores para estabilizar la molécula de proteína de fusión terapéutica.

[0066] Las formulaciones descritas de la invención usan cantidades menores de alcohol de azúcar para estabilizar la molécula de proteína de fusión terapéutica. Y las formulaciones descritas de las formulaciones de proteína de fusión CTLA4-Ig que comprenden regulador, poliol, aminoácido y tensioactivo son estables y pueden soportar múltiples ciclos de congelación-descongelación y también estrés inducido por agitación.

[0067] La invención descrita, es decir, la formulación de la proteína de fusión, CTLA4-Ig (abatacept), se estabiliza principalmente mediante la combinación de histidina y manitol. Sorprendentemente, la adición de sacarosa o cualquier otro aminoácido a la formulación, de hecho, no mejora la estabilidad de la proteína de fusión. El abatacept, que es una proteína de fusión y de naturaleza dimérica, es una molécula compleja, propensa a la agregación y oxidación, sin embargo, se estabiliza inesperadamente solo por el aminoácido histidina (y poliol).

EJEMPLOS

[0068] La molécula de proteína de fusión CTLA4-Ig, abatacept, adecuada para el almacenamiento en la presente composición farmacéutica, se produce mediante métodos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, el abatacept se prepara mediante la expresión recombinante de CTLA4 fusionado con la porción CH2 y CH3 de IgG humana en una célula huésped de mamífero, como las células de ovario de hámster chino. Además, el abatacept expresado se recolecta y la recolección en bruto se somete a etapas estándar del proceso corriente abajo que incluyen purificación, filtración y opcionalmente etapas de dilución o concentración. Por ejemplo, la cosecha bruta de abatacept puede purificarse usando técnicas de cromatografía estándar tales como cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico y combinaciones de las mismas. La solución de abatacept purificada se puede someter adicionalmente a una o más etapas de filtración y la solución obtenida se somete a más estudios de formulación.

Ejemplo 1: Cribado y selección de regulador adecuado para formular abatacept

[0069] Para seleccionar reguladores adecuados para estabilizar el abatacept, se prepararon varios reguladores. Se intercambiaron 40 mg/ml de abatacept en fondo de regulador de fosfato obtenido del proceso cromatográfico corriente abajo y se diluyeron a 25 mg/ml en los respectivos fondos de regulador diferentes. Los detalles de las formulaciones se dan en la Tabla 1.

[0070] Todas las formulaciones de abatacept se sometieron a estudios de estabilidad acelerados a 25 °C y 40 °C durante cuatro semanas. Posteriormente, las muestras se analizaron en busca de especies de alto peso molecular (HMW) y especies de bajo peso molecular (BPM) [los resultados se muestran en las Tablas 2 y 3] mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y también se verificó el cambio de pH [Tabla 4] e inspección visual [Tabla 5].

[0070] Tabla 1: Composiciones de varias formulaciones de abatacept en diferentes reguladores según el ejemplo 1

Nombre de Muestra	Composición
Aba-IV-1	Abatacept 25 mg/ml, regulador de fosfato 10 mM, pH 7.2
Aba- IV-2	Abatacept 25 mg/ml, regulador de histidina 20 mM, pH 7.1
Aba- IV-3	Abatacept 25 mg/ml, regulador citrato 20 mM, pH 7.1
Aba- IV-4	Abatacept 25 mg/ml, regulador de histidina-fosfato 20 mM, pH 7.1

[0071] Tabla 2: Datos SEC de formulaciones de abatacept (25 mg/ml) preparadas según el ejemplo 1

	Especies de Alto Peso Molecular (HMW)		
	T0	40 °C	25 °C

Nombre de Muestra	0S	1S	2S	4S	Δ 2S	Δ 4S	2S	4S	Δ 2S	Δ 4S
Aba-IV-1	26.7	34.9	37.4	40.4	10.7	13.7	29.1	29.7	2.4	3.0
Aba- IV-2	26.2	75.9	77.7	55.8	51.5	29.6	28.2	28.6	2.1	2.4
Aba- IV-3	27.3	41.7	41.2	40.4	13.9	13.1	32.5	32.5	5.2	5.2
Aba- IV-4	27.0	64.1	50.9	42.8	23.9	15.8	30.2	30.9	3.2	3.9

S-indica semanas, T0 indica un punto de tiempo "cero", Δ -Delta indica un cambio en un valor desde el punto de tiempo cero hasta un punto de tiempo específico

- 5 **[0073]** Tabla 3: Datos SEC de formulaciones de abatacept (25 mg/ml) preparadas según el ejemplo 1 a 40 °C y 25 °C

Nombre de Muestra	Especies de Bajo Peso Molecular (BPM)									
	T0	40 °C					25 °C			
	W0	1S	2S	4S	Δ 2S	Δ 4S	2S	4S	Δ 2S	Δ 4S
Aba-IV-1	0.0	0.3	0.3	0.6	0.3	0.6	0.1	0.3	0.1	0.3
Aba- IV-2	0.0	0.1	0.2	3.4	0.2	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0
Aba- IV-3	0.0	0.6	1.3	0.8	1.3	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0
Aba- IV-4	0.0	0.4	3.7	7.1	3.7	7.1	0.1	0.0	0.1	0.0

- 10 S-indica semanas, T0 indica un punto de tiempo "cero", Δ -Delta indica un cambio en un valor desde el punto de tiempo cero hasta un punto de tiempo específico

Tabla 4: pH de las formulaciones de abatacept (25 mg / ml) preparadas según el ejemplo 1 a 40 °C y 25 °C

Nombre de Muestra	pH				
	T0	40 °C			25 °C
	0S	4S	Δ pH	4S	Δ pH
Aba-IV-1	7.1	7.3	0.2	7.3	0.2
Aba- IV-2	6.8	8.1	1.3	6.7	0.1
Aba- IV-3	7.1	8.5	1.4	8.6	1.5
Aba- IV-4	6.8	7.9	1.1	8.0	1.2

- 15 S-indica semanas, T0 indica un punto de tiempo "cero", Δ -Delta indica un cambio en un valor desde el punto de tiempo cero hasta un punto de tiempo específico

[0074] Tabla 5: Datos de inspección visual de formulaciones de abatacept (25 mg/ml) preparadas según el ejemplo 1

Nombre de Muestra	Inspección Visual				
	T0	40 °C		25 °C	
	0S	2S	4S	2S	2S
Aba-IV-1	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro
Aba- IV-2	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro
Aba- IV-3	Claro	Ligeramente opalescente	Ligeramente opalescente	opalescente	opalescente

Aba- IV-4	Claro	opalescente	opalescente	opalescente	opalescente
-----------	-------	-------------	-------------	-------------	-------------

S-indica semanas

Ejemplo 2: Formulaciones de abatacept de alta concentración (~125 mg/ml) en presencia de azúcar(s) y aminoácido(s)

[0075] Se intercambiaron aproximadamente 120 mg/ml de abatacept en fondo de regulador de fosfato obtenido de la etapa de filtración de flujo tangencial (TFF) del proceso corriente en regulador en fondo de regulador respectivo. Posteriormente, se agregaron diversos excipientes como azúcares y aminoácidos a las formulaciones de abatacept de alta concentración en diferentes combinaciones y concentraciones. Los detalles de las formulaciones se dan en la Tabla 6. La formulación subcutánea de abatacept aprobada por la FDA contiene regulador de fosfato, 170 mg/ml de sacarosa y Poloxamer. Por lo tanto, para mantener un estándar de referencia, se añadieron a la formulación hasta ~ 120 mg/ml de abatacept interno en fondo de regulador de fosfato, 170 mg/ml de sacarosa y 8 mg/ml de Poloxamer.

[0076] Todas las formulaciones de abatacept de alta concentración se sometieron a estudios de estabilidad acelerados a 30 °C durante dos semanas. Posteriormente, las muestras se analizaron para especies de alto peso molecular (HMW) [los resultados se muestran en la Tabla 7] usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y también se verificaron los cambios en el pH [Tabla 8] y la inspección visual [Tabla 9]. También se comprobó la dispersión de luz de las muestras de proteínas a 333 nm utilizando nano gotas y los resultados se representan en la Tabla 10.

[0077] Tabla 6: Composiciones de varias formulaciones de abatacept de alta concentración (~ 120 mg/ml) preparadas según el ejemplo 2

Nombre de Muestra	Composición
Aba-Ref	120 mg/ml de Abatacept, regulador de fosfato, 170 mg/ml de sacarosa, 8 mg/ml de poloxámero pH 6.8-7.2
Aba-SC-1	120 mg/ml de Abatacept, regulador de fosfato, 10 mg/ml de histidina, 8 mg/ml de poloxámero, pH 7.2
Aba-SC-2	120 mg/ml de Abatacept, regulador de fosfato, 10 mg/ml de arginina, 8 mg/ml de poloxámero, pH 7.2
Aba-SC-3	120 mg/ml de abatacept, regulador de fosfato, 10 mg/ml de histidina, 10 mg/ml de arginina, 10 mM de NaCl, 8 mg/ml de poloxámero, pH 7.2
Aba-SC-4	120 mg/ml de abatacept, regulador de fosfato, 125 mg/ml de sacarosa, 5 mg/ml de lisina, 10 mg/ml de glicina, 10 mg/ml de arginina, 10 mg/ml de histidina, 8 mg/ml de poloxámero, pH 7.2
Aba-SC-5	120 mg/ml de Abatacept, regulador de fosfato, 125 mg/ml de manitol, 5 mg/ml de lisina, 10 mg /ml de glicina, 10 mg/ml de arginina, 10 mg/ml de histidina, 8 mg/ml de poloxámero, pH 7.2
Aba-SC-6	120 mg/ml de Abatacept, regulador de fosfato, 125 mg/ml de sorbitol, 5 mg/ml de lisina, 10 mg /ml de glicina, 10 mg/ml de arginina, 10 mg/ml de histidina, 8 mg/ml de poloxámero, pH 7.2
Aba-SC-7	120 mg/ml de Abatacept, regulador de fosfato, 125 mg/ml de sacarosa, 10 mg/ml de histidina, 8 mg/ml de poloxámero, pH 7.2
Aba-SC-8	120 mg/ml de Abatacept, regulador citrato-fosfato, 125 mg/ml de manitol, 10 mg/ml de histidina, 8 mg/ml de poloxámero, pH 7.2

[0078] Tabla 7: Datos SEC de formulaciones de abatacept de alta concentración (~ 120 mg / ml) preparadas según el ejemplo 2

Nombre de Muestra	Contenido de dímero a 30 °C			Especies de alto peso molecular a 30 °C			Especies de bajo peso molecular a 30 °C		
	0S	1S	2S	0S	1S	2S	0S	1S	2S

Aba-Ref	97.8	92.9	88.7	2.2	7.1	11.0	0.0	0.0	0.3
Aba-SC-1	97.6	84.8	75.2	2.4	15.2	24.8	0.0	0.0	0.0
Aba-SC-2	97.6	89.2	71.3	2.3	13.0	28.6	0.0	0.0	0.2
Aba-SC-3	97.7	89.7	79.7	2.3	10.3	20.1	0.0	0.0	0.2
Aba-SC-4	97.6	79.6	55.5	2.4	5.8	17.3	0.0	14.6	27.2
Aba-SC-5	97.6	94.5	86.8	2.4	4.7	10.7	0.0	0.8	2.5
Aba-SC-6	97.6	87.7	69.7	2.4	6.5	12.5	0.0	0.0	10.1
Aba-SC-7	97.6	92.4	86.8	2.4	7.6	13.2	0.0	0.0	0.0
Aba-SC-8	97.7	94.4	92.6	2.3	5.6	7.5	0.0	0.0	0.0

S- indica semanas

[0079] Tabla 8: pH de formulaciones de abatacept de alta concentración preparadas como en el ejemplo 2 a 30 °C

5

	pH a 30 °C			
	0S	1S	2S	Δ pH at 2W
Aba-Ref	7.0	6.8	6.8	-0.2
Aba-SC-1	7.3	7.1	7.2	-0.1
Aba-SC-2	6.9	6.8	6.8	-0.1
Aba-SC-3	7.3	7.2	7.2	-0.1
Aba-SC-4	7.1	6.6	6.6	-0.5
Aba-SC-5	7.1	7.2	7.8	0.7
Aba-SC-6	7.1	6.6	7.4	0.3
Aba-SC-7	7.3	7.1	7.1	-0.2
Aba-SC-8	7.5	7.4	7.4	-0.1

S-indica semanas, Δ-Delta indica cambio en un valor desde el punto de tiempo cero hasta un punto de tiempo especificado.

10

[0080] Tabla 9: Datos de inspección visual de formulaciones de abatacept de alta concentración preparadas según el ejemplo 2

Nombre de Muestra	Inspección Visual 30 °C		
	0S	1S	2S
Aba-Ref	Claro, incoloro	Claro, incoloro	Claro, incoloro
Aba-SC-1	Claro, incoloro	Claro, incoloro	Claro, incoloro
Aba-SC-2	Claro, incoloro	Claro, incoloro	Claro, incoloro
Aba-SC-3	Claro, incoloro	Claro, incoloro	Claro, incoloro
Aba-SC-4	Claro, incoloro	Claro, incoloro	Claro, incoloro
Aba-SC-5	Claro, incoloro	Claro, incoloro	Claro, incoloro
Aba-SC-6	Claro, incoloro	Claro, incoloro	Claro, incoloro

Aba-SC-7	Claro, incoloro	Claro, incoloro	Claro, incoloro
Aba-SC-8	Claro, incoloro	Claro, incoloro	Claro, incoloro

S-indica semanas

[0081] Tabla 10: Datos de dispersión de luz a 333 nm (A333) de formulaciones de abatacept de alta concentración preparadas según el ejemplo 3 a 30 °C

5

Nombre de Muestra	Datos de dispersión de luz 30 °C		
	0S	1S	2S
Aba-Ref	0.1	0.1	0.2
Aba-SC-1	0.0	0.2	0.4
Aba-SC-2	0.0	0.1	0.0
Aba-SC-3	0.1	0.1	0.0
Aba-SC-4	0.0	0.1	0.1
Aba-SC-5	0.0	0.2	0.2
Aba-SC-6	0.1	0.1	0.1
Aba-SC-7			
Aba-SC-8	0.1	0.1	0.0

Ejemplo 3: Adición de excipientes durante la etapa de Filtración de Flujo Tangencial (TFF) sobre la estabilidad de proteínas de fusión CTLA4-Ig de alta concentración

10 **[0082]** En el ejemplo 2, la CTLA4-Ig purificada obtenida de la etapa cromatográfica corriente abajo se intercambió adicionalmente con regulador en regulador de fosfato y se concentró mediante filtración de flujo tangencial (TFF). Posteriormente, se agregaron excipientes a las formulaciones. Sin embargo, a diferencia de esta estrategia convencional, se incorporaron diversos azúcares como sacarosa y manitol y aminoácidos como histidina y glicina durante la propia TFF (es decir, antes del paso de formulación o antes de formular la proteína como producto farmacéutico). Se sometió a ultrafiltración una concentración de 8-15 mg/ml de proteína de fusión de abatacept en regulador acetato obtenido de la etapa cromatográfica para concentrar hasta 60 mg/ml. Posteriormente, las muestras se sometieron a diafiltración en donde el medio de diafiltración contenía regulador de fosfato (regulador de formulación) sin y con excipientes como azúcares y aminoácidos, y en otro experimento separado, el medio de diafiltración sin azúcar y aminoácidos en el regulador de fosfato. Después de la diafiltración, las muestras se sometieron a una segunda ultrafiltración para concentrar hasta 180 mg/ml a 200 mg/ml. Se encontró que estas muestras de alta concentración eran estables sin partículas/agregados visibles. Las muestras altamente concentradas se diluyeron adicionalmente a 125 mg/ml y se añadieron algunos de los excipientes como azúcares, tensioactivo y opcionalmente aminoácidos como glicina para preparar una formulación final. Se añadieron 8 mg/ml de poloxámero a toda la formulación final. Los detalles de las formulaciones se dan en la Tabla 11. Después de lo cual, todas las muestras fueron sometidas a estudios de estabilidad acelerados a 30 °C durante 2 semanas. Las muestras se analizaron en busca de especies de alto peso molecular (HMW) y forma de dímero activo [los resultados se muestran en la Tabla 12] usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y también se verificaron cambios en el pH [Tabla 13] e inspección visual [Tabla 14].

[0083] Tabla 11: Composiciones de diversas formulaciones de abatacept de alta concentración preparadas según el ejemplo 3

30

Nombre de Muestra	Composición del regulador de formulación durante TFF	Composición de la formulación después de TFF
Aba-SC-9	Regulador de fosfato 20 mM	125 mg/ml de Abatacept, regulador de fosfato 20 mM, poloxámero 8 mg/ml, pH 7.2
Aba-SC-10	Regulador de fosfato 20 mM y 75 mg/ ml de Sacarosa	125 mg/ml de abatacept, regulador de fosfato 20 mM, sacarosa 170 mg/ml, poloxámero 8 mg/ml, pH 7.2

Aba-SC-11	Regulador de fosfato 20 mM y 75 mg/ ml de sacarosa	125 mg/ml de Abatacept, regulador de fosfato 20 mM, sacarosa 100 mg/ml, lisina 10 mg/ml, NaCl 0.58 mg /ml, poloxámero 8 mg/ml, pH 7.2
Aba-SC-12	Regulador de fosfato 20 mM, 75 mg/ml de manitol	125 mg/ml de Abatacept, regulador de fosfato 20 mM, 75 mg/ml de manitol, 6.6 mg/ml de sulfato de amonio, 8 mg/ml de poloxámero, pH 7.2
Aba-SC-13	Regulador de fosfato 20 mM, 75 mg/ml de manitol	125 mg/ml de abatacept, regulador de fosfato 20 mM, manitol 100 mg/ml, glicina 10 mg/ml, poloxámero 8 mg/ml, pH 7.2
Aba-SC-14	Regulador de fosfato 20 mM; 75 mg/ ml de manitol, 10 mg/ml de histidina	125 mg/ml de abatacept, regulador de fosfato 20 mM, manitol 75 mg/ml, histidina 10 mg/ml, poloxámero 8 mg/ml, pH 7.2
Aba-SC-15	Regulador de fosfato 20 mM; 75 mg/ ml de manitol, 15 mg/ml de histidina	125 mg/ml de abatacept, regulador de fosfato 20 mM, manitol 75 mg/ml, histidina 15 mg/ml, poloxamer 8 mg/ml, pH 7.2
Aba-SC-16	Regulador de fosfato 20 mM; 75 mg/ ml de manitol, 10 mg/ml de histidina	125 mg/ml de abatacept, regulador de fosfato 20 mM, manitol 75 mg/ml, histidina 10 mg/ml, glicina 5 mg/ ml, poloxámero 8 mg/ml, pH 7.2
Aba-SC-17	Regulador de fosfato 20 mM; 75 mg/ ml de manitol, 15 mg/ml de histidina	125 mg/ml de abatacept, regulador de fosfato 20 mM, manitol 75 mg/ml, histidina 15 mg/ml, glicina 5 mg/ ml, poloxámero 8 mg/ml, pH 7.2
Aba-SC-18	Regulador de fosfato 20 mM; 85 mg/ml de manitol, 10 mg/ml de histidina	125 mg/ml de abatacept, regulador de fosfato 20 mM, manitol 85 mg/ml, histidina 10 mg/ml, poloxámero 8 mg/ml, pH 7.2
Aba-SC-19	Regulador de fosfato 20 mM; 85 mg/ ml de manitol, 10 mg/ml de histidina	125 mg/ml de abatacept, regulador de fosfato 20 mM, manitol 85 mg/ml, histidina 10 mg/ml, glicina 5 mg/ ml, poloxámero 8 mg/ml, pH 7.2
Aba-SC-20	Regulador de fosfato 20 mM; 85 mg/ ml de manitol, 15 mg/ml de histidina	125 mg/ml de Abatacept, regulador de fosfato 20 mM, manitol 85 mg/ml, histidina 15 mg/ml, poloxámero 8 mg/ml, pH 7.2
Aba-SC-21	Regulador de fosfato 20 mM, 75 mg/ ml de manitol, 10 mg/ml de histidina	125 mg/ml de abatacept, regulador de fosfato 20 mM, manitol 75 mg/ml, histidina 10 mg/ml, prolina 10 mg/ ml, poloxámero 8 mg/ml, pH 7.2

[0084] Tabla 12: Datos SEC de formulaciones de abatacept de alta concentración preparadas según el ejemplo 3

Nombre de Muestra	Contenido de dímero a 30 °C		Especies de alto peso molecular a 30 °C		Especies de bajo peso molecular a 30 °C	
	0S	2S	0S	2S	0S	2S
Aba-SC-9	98.6	59.7	1.4	37.6	0	2.7
Aba-SC-10	98.6	87.6	1.4	12.4	0	0
Aba-SC-11	98.7	75.8	1.3	24.2	0	0

Aba-SC-12	98.2	87.3	1.8	12.6	0	0.1
Aba-SC-13	98.9	88.2	1.2	11.9	0	0
Aba-SC-14	98.8	91.2	1.2	8.8	0	0
Aba-SC-15	98.9	92.0	1.1	8.1	0	0
Aba-SC-16	98.8	91.7	1.2	8.3	0	0
Aba-SC-17	98.9	92.4	1.1	7.6	0	0
Aba-SC-18	98.9	91.7	1.1	8.3	0	0
Aba-SC-19	98.9	92.0	1.1	8.0	0	0
Aba-SC-20	98.8	92.3	1.2	7.7	0	0
Aba-SC-21	99.0	87.5	1.0	12.5	0	0

[0085] Tabla 13: Datos de pH de formulaciones de abatacept de alta concentración preparadas según el ejemplo 3

Nombre de Muestra	pH a 30 °C		
	0S	2S	Δ pH a 2 S
Aba-SC-9	6.9	6.1	-0.8
Aba-SC-10	7.0	6.9	-0.1
Aba-SC-11	6.8	6.8	0
Aba-SC-12	7.0	7.1	0.1
Aba-SC-13	NP	NP	NA
Aba-SC-14	7.0	6.9	-0.1
Aba-SC-15	7.0	7.1	0.1
Aba-SC-16	7.1	7.2	0.1
Aba-SC-17	7.0	7.1	0.1
Aba-SC-18	7.1	7.2	0.1
Aba-SC-19	7.0	7.1	0.1
Aba-SC-20	7.0	7.1	0.1
Aba-SC-21	7.1	7.2	0.1

5 S-indica-semanas, NP-No probado debido a la restricción de la muestra; NA-no aplicable

[0086] Tabla 14: Datos de inspección visual de formulaciones de abatacept de alta concentración preparadas según el ejemplo 3

Nombre de Muestra	Inspección Visual a 30 °C	
	0S	2S
Aba-SC-9	Claro	Túrbido
Aba-SC-10	Claro, incoloro, sin partículas visibles	Claro, incoloro, sin partículas visibles
Aba-SC-11	Claro, incoloro, sin partículas visibles	Claro, incoloro, sin partículas visibles
Aba-SC-12	Claro, incoloro, sin partículas visibles	Claro, incoloro, sin partículas visibles
Aba-SC-13	Claro, incoloro, sin partículas visibles	Claro, incoloro, sin partículas visibles
Aba-SC-14	Claro, incoloro, sin partículas visibles	Claro, incoloro, sin partículas visibles
Aba-SC-15	Claro, incoloro, sin partículas visibles	Claro, incoloro, sin partículas visibles
Aba-SC-16	Claro, incoloro, sin partículas visibles	Claro, incoloro, sin partículas visibles

Aba-SC-17	Claro, incoloro, sin partículas visibles	Claro, incoloro, sin partículas visibles
Aba-SC-18	Claro, incoloro, sin partículas visibles	Claro, incoloro, sin partículas visibles
Aba-SC-19	Claro, incoloro, sin partículas visibles	Claro, incoloro, sin partículas visibles
Aba-SC-20	Claro, incoloro, sin partículas visibles	Claro, incoloro, sin partículas visibles
Aba-SC-21	Claro, incoloro, sin partículas visibles	Claro, incoloro, sin partículas visibles

[0087] Se midió la viscosidad de algunas de las formulaciones de abatacept (Aba-SC-14 y Aba-SC-18) preparadas según el ejemplo 3 utilizando un viscosímetro m-VROC® y la viscosidad de las formulaciones (Aba-SC-14 y Aba-SC-18) resultaron ser 9.0 mPa/S.

Ejemplo 4: Estabilidad coloidal de formulaciones de proteína de abatacept de alta concentración

- 5 [0088] Las formulaciones de abatacept, que contienen azúcar y aminoácidos se sometieron a dispersión dinámica de luz (DLS) para medir el coeficiente de difusión, diámetro hidrodinámico que es indicativo de la solubilidad del abatacept. Las mediciones de DLS a su vez brindan información sobre la estabilidad coloidal de una molécula de proteína. Los resultados de los mismos están representados en la Tabla-15.

10 Tabla 15: Datos de dispersión dinámica de luz (DLS) de formulaciones de abatacept de alta concentración preparadas según el ejemplo 3

Nombre de Muestra	Composición	Radio hidrodinámico (Rh) (nm)		Coeficiente de difusión (cm ² /s)	
		0S	4 S a 30 °C	0S	4 S a 30 °C
Aba-SC-14	125 mg/ml de Abatacept, regulador de fosfato 20 mM, manitol 75 mg/ml, histidina 10 mg/ml, poloxámero 8 mg/ml, pH 7.2	5.7	5.9	4.34E-07	4.20E-07
Aba-SC-18	125 mg/ml de Abatacept, regulador de fosfato 20 mM, manitol 85 mg/ml, histidina 10 mg/ml, poloxámero 8 mg/ml, pH 7.2	5.6	5.4	4.37E-07	4.60E-07
Aba-SC-22	125 mg/ml de Abatacept, regulador de fosfato 20 mM, sacarosa 100 mg/ml, histidina 10 mg/ml, Poloxamer 8 mg/ml	10.0	12.7	2.49E-07	2.00E-07

24 de mayo de 2019

Firma: _____

Dr. V R Srinivas

15

Dr. Reddy's Laboratories Ltd.