

**FORMULACIONES QUE COMPRENDEN VARIANTES POLIPEPTÍDICAS DE
ACTRIIA**

REFERENCIA CRUZADA A LA SOLICITUD RELACIONADA

[0001] Esta solicitud reclama el beneficio de la Solicitud Provisional de EE. UU. nro. 63/451,198, presentada el 9 de marzo de 2023, cuyo contenido se incorpora por referencia en su totalidad.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADO ELECTRÓNICAMENTE

[0002] La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato XML y se incorpora por referencia en su totalidad. El archivo XML, creado el 29 de enero de 2024, se llama 1848179-0002-169-WO1_SL.XML y tiene un tamaño de 37.058 bytes.

CAMPO DE LA INVENCION

[0003] En el presente documento se describen formulaciones farmacéuticas liofilizadas que comprenden una proteína de fusión recombinante que comprende un dominio extracelular (ECD) de la proteína del receptor de activina humana tipo IIA (ActRIIa) o derivados de la misma unidos a un dominio constante de una inmunoglobulina, como el dominio Fc de IgG1 humana y uno o más aditivos farmacéuticos y/o excipientes como se define en este documento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0004] La hipertensión pulmonar (HP) es una enfermedad caracterizada por presión arterial alta en la vasculatura pulmonar, incluidas las arterias pulmonares, las venas pulmonares y los capilares pulmonares. En general, la HP se define como una presión arterial pulmonar (PA) media ≥ 25 mm Hg en reposo o ≥ 30 mm Hg con ejercicio (Hill et al., Respiratory Care 54 (7): 958-68 (2009)). El síntoma principal de la HP es dificultad para respirar o falta de aliento, y otros síntomas incluyen fatiga, mareos, desmayos, edema periférico (hinchazón en pies, piernas o tobillos), labios y piel azulados, dolor en el pecho, angina de pecho, mareos durante el ejercicio, tos no productiva, pulso acelerado y palpitaciones. La HP puede ser una enfermedad grave que causa insuficiencia cardíaca, que es una de las causas más comunes de muerte en personas que tienen hipertensión pulmonar. La hipertensión pulmonar postoperatoria puede complicar muchos tipos de cirugías o procedimientos, y presentar un desafío asociado con una alta mortalidad.

[0005] La HP se puede agrupar en función de diferentes manifestaciones de la enfermedad que comparten similitudes en los mecanismos fisiopatológicos, la presentación clínica y los enfoques terapéuticos (Simonneau et al., JACC 54 (1): S44-54 (2009)). La clasificación clínica de la HP se propuso por primera vez en 1973, y la Organización Mundial de la Salud (OMS) aprobó una clasificación clínica actualizada recientemente en 2008. De acuerdo con la clasificación clínica actualizada de HP, existen cinco grupos principales de HP: (1) hipertensión arterial pulmonar (HAP), caracterizada por una presión arterial de enclavamiento ≤ 15 mm Hg; (2) HP debido a una enfermedad cardíaca izquierda (también conocida como hipertensión venosa pulmonar o insuficiencia cardíaca congestiva), (3) HP caracterizada por una presión arterial de enclavamiento >15 mm Hg; (4) HP debido a enfermedades pulmonares y/o hipoxia; PH por tromboembolia crónica; y (5) HP con etiologías poco claras o multifactoriales (Simonneau et al., JACC 54 (1): S44-54 (2009); Hill et al., Respiratory Care 54 (7): 958-68 (2009)). La HAP se clasifica, además, en HAP idiopática (IPAH), una enfermedad esporádica en la que no hay antecedentes familiares de HAP ni un factor de riesgo identificado; HAP hereditaria; HAP inducida por fármacos y toxinas; HAP asociada con enfermedades del tejido conectivo, infección por VIH, hipertensión portal, cardiopatías congénitas, esquistosomiasis y anemia hemolítica crónica; e HP persistente de los recién nacidos (Simonneau et al., JACC 54 (1): S44-54 (2009)). El diagnóstico de varios tipos de HP requiere una serie de pruebas.

[0006] En general, el tratamiento de la HP depende de la causa o clasificación de la HP. Cuando la HP es causada por un medicamento o una afección médica conocida, se conoce como HP secundaria y su tratamiento generalmente se dirige a la enfermedad subyacente. El tratamiento de la hipertensión venosa pulmonar generalmente implica optimizar la función ventricular izquierda mediante la administración de diuréticos, beta bloqueadores e inhibidores de la ECA, o reparar o reemplazar una válvula mitral o una válvula aórtica. Las terapias para la HAP incluyen vasodilatadores pulmonares, digoxina, diuréticos, anticoagulantes y oxigenoterapia. Los vasodilatadores pulmonares se dirigen a diferentes vías, incluida la vía de la prostaciclina (p. ej., prostaciclina, incluido el epoprostenol intravenoso, el treprostinil subcutáneo o intravenoso y el iloprost inhalado), la vía del óxido nítrico (p. ej., los inhibidores de la fosfodiesterasa-5, incluidos el sildenafil y el tadalafil) y la vía de la endotelina-1 (p. ej., antagonistas de los receptores de endotelina, incluidos el bosentan oral y el ambrisetano oral) (Humbert, M. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 179:650-6 (2009); Hill et al., Respiratory Care 54 (7): 958-68 (2009)). Sin embargo, las terapias actuales no proporcionan cura para la HP y no tratan directamente el remodelado vascular subyacente y la muscularización de los vasos sanguíneos observadas en muchos pacientes con HP.

[0007] Por lo tanto, es objeto de la presente descripción proporcionar formulaciones farmacéuticas que comprenden una proteína de fusión de ActRIIa y los métodos correspondientes para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de la HP, en particular el tratamiento, la prevención o la reducción de la tasa de progresión y/o la gravedad de una o más complicaciones asociadas a la HP.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0008] En el presente documento se proporcionan formulaciones farmacéuticas que comprenden una proteína de fusión recombinante que comprende un dominio extracelular (ECD) del receptor de activina humano tipo IIA (ActRIIa) o una variante del mismo unida a un dominio constante de una inmunoglobulina, como un dominio Fc de IgG1 humana, y uno o más aditivos farmacéuticos y/o excipientes, en donde la formulación está liofilizada.

[0009] En algunas modalidades, la proteína ActRIIa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 % (p. ej., al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a una secuencia de aminoácidos que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 del SEQ ID NO: 9 y termina en cualquiera de los aminoácidos 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 o 135 del SEQ ID NO: 9. En algunas modalidades, la proteína ActRIIa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 % (p. ej., al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 10. En algunas modalidades, la proteína ActRIIa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 % (p. ej., al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 11. En algunas modalidades, la proteína ActRIIa es una proteína de fusión que comprende un dominio extracelular de ActRIIa y uno o más dominios proteicos heterólogos a ActRIIa. En algunas modalidades, la proteína ActRIIa es una proteína de fusión que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina. En algunas modalidades, el dominio Fc de la inmunoglobulina es un dominio Fc de una inmunoglobulina IgG1. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa comprende, además, un dominio enlazador situado entre el dominio de la proteína ActRIIa y uno o más dominios heterólogos (p. ej., un dominio de inmunoglobulina Fc). En algunas modalidades, el dominio del enlazador se selecciona del grupo que consta de: TGGG (SEQ ID NO: 23), TGGGG (SEQ ID NO: 21), SGGGG (SEQ ID NO: 22), GGGGS (SEQ ID NO: 25), GGG (SEQ ID NO: 19), GGGG (SEQ ID NO: 20) y SGGG (SEQ ID NO: 24). En algunas modalidades, la proteína

de fusión de ActRIIa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 41. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32 o 41. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa consiste en una variante de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 32, en donde la secuencia carece del residuo de lisina C-terminal del SEQ ID NO: 32. En algunas modalidades, la variante de la proteína de fusión de ActRIIa que carece del residuo de lisina C-terminal comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:41. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa es parte de un complejo de proteínas homodímeras. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa está glicosilada. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa tiene un patrón de glicosilación que se puede obtener mediante expresión en una célula de ovario de hámster chino.

[0010] Las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento comprenden una proteína de fusión de ActRIIa y uno o más aditivos farmacéuticos y/o excipientes. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento comprenden una proteína de fusión de ActRIIa humana o una variante de la misma, un amortiguador, un tensioactivo y un estabilizante.

[0011] En algunas modalidades, uno o más de los aditivos farmacéuticos y/o excipientes es un agente regulador del pH (amortiguador). En algunas modalidades, el agente amortiguador se selecciona para que sea fisiológicamente compatible y para mantener un pH superior a 2. En algunas modalidades, el agente amortiguador se selecciona para que sea fisiológicamente compatible y capaz de mantener una solución liofilizada reconstituida descrita en este documento a un pH superior a 2. En algunas modalidades, el agente amortiguador se selecciona para que sea fisiológicamente compatible y para mantener un pH de la formulación farmacéutica a un pH de 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 o 9,0. En algunas modalidades, el agente amortiguador se selecciona para que sea fisiológicamente compatible y para mantener un pH de la formulación farmacéutica entre 5-7 (es decir, 5,0-7,0). En algunas modalidades, el agente amortiguador se selecciona para

que sea fisiológicamente compatible y para mantener un pH de la formulación farmacéutica a un pH de 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 o 7,0. En algunas modalidades, el agente amortiguador se selecciona para que sea fisiológicamente compatible y para mantener un pH de la formulación farmacéutica entre un pH de 5,5-6,5 (es decir, de 5,5 a 6,5). En algunas modalidades, el agente amortiguador se selecciona para que sea fisiológicamente compatible y para mantener un pH de la formulación farmacéutica de 5,8.

[0012] En algunas modalidades, el agente amortiguador comprende ácidos orgánicos, succinato, fosfato, acetato, citrato, ácido cítrico, Tris, HEPES, aminoácidos o mezclas de aminoácidos. En ciertas modalidades, el amortiguador se selecciona del grupo que consiste en citrato de sodio, succinato e histidina. En algunas modalidades, el agente amortiguador comprende citrato. En ciertas modalidades, en donde el amortiguador es citrato, el amortiguador de citrato comprende citrato trisódico dihidrato y ácido cítrico monohidratado. En algunas modalidades, el agente amortiguador comprende citrato trisódico dihidratado. En algunas modalidades, el agente amortiguador comprende ácido cítrico monohidrato. En algunas modalidades, el agente amortiguador comprende citrato trisódico dihidrato y ácido cítrico monohidratado. En ciertas modalidades, en donde la proteína tiene una carga negativa debido a la presencia de glicanos, el amortiguador no es histidina.

[0013] En algunas modalidades, el agente amortiguador está presente en una cantidad de entre 4 mM y 50 mM. En algunas modalidades, el agente amortiguador está presente en una concentración de al menos 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 o 500 mM. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende al menos 10 mM de agente amortiguador.

[0014] En algunas modalidades, el agente amortiguador es un amortiguador de citrato que mantiene un pH de la formulación farmacéutica a un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente pH 6,5. En algunas modalidades, el agente amortiguador es un amortiguador de succinato que mantiene un pH de la formulación farmacéutica a un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente pH 6,5. En algunas modalidades, el agente amortiguador es un amortiguador de histidina que mantiene un pH de la formulación farmacéutica a un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente pH 6,0. En algunas modalidades, el agente amortiguador es un amortiguador de citrato que mantiene un pH de la formulación farmacéutica a un pH de aproximadamente 5,8. En algunas modalidades, el agente amortiguador es un amortiguador de succinato que mantiene un pH de la formulación farmacéutica a un pH de aproximadamente 5,8.

[0015] En algunas modalidades, el agente amortiguador es 10 mM de un amortiguador de citrato que mantiene un pH de la formulación farmacéutica a un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente pH 6,5. En algunas modalidades, el agente amortiguador es 10 mM de un amortiguador de succinato que mantiene un pH de la formulación farmacéutica a un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente pH 6,5. En algunas modalidades, el agente amortiguador es 10 mM de un amortiguador de histidina que mantiene un pH de la formulación farmacéutica a un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente pH 6,0. En algunas modalidades, el agente amortiguador es 10 mM de un amortiguador de citrato que mantiene un pH de la formulación farmacéutica a un pH de aproximadamente 5,8. En algunas modalidades, el agente amortiguador es 10 mM de un amortiguador de succinato que mantiene un pH de la formulación farmacéutica a un pH de aproximadamente 5,8.

[0016] En algunas modalidades, uno o más de los aditivos farmacéuticos y/o excipientes es un tensioactivo. En algunas modalidades, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en: lauril sulfato de sodio, sulfosuccinato de sodio de dioctilo y sulfonato de sodio de dioctilo, ácido quenodesoxicólico, sal de sodio de N-lauroilsarcosina, sulfato de dodecilo de litio, sal de sodio de ácido sulfónico de 1-octano, hidrato de colato de sodio, desoxicolato de sodio y sal de sodio de ácido glicodesoxicólico, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio monohidratado, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, CHAPS, CHAPSO, SB3-10, SB3-12, digitonina, Tritón X-100, Tritón X-114, TWEEN-20, TWEEN-80, lauromacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 10, 40, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 65, polisorbato 80 y lecitina de soja. En algunas modalidades, el tensioactivo es polisorbato 80 o polisorbato 20. En algunas modalidades, el tensioactivo es polisorbato 80.

[0017] En algunas modalidades, el tensioactivo está presente en una cantidad de 0,05-0,3 mg/ml. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende al menos 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 % en peso/volumen de tensioactivo. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende un tensioactivo de 0,01 a 0,05 % en peso/volumen. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende al menos un 0,02 % de tensioactivo en peso/volumen. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende un tensioactivo de 0,02 % en peso/volumen. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende polisorbato 80 o polisorbato 20 al 0,02 %.

[0018] En algunas modalidades, uno o más de los aditivos farmacéuticos y/o excipientes son estabilizantes. En algunas modalidades, el estabilizante se selecciona del grupo que consiste en:

sacarosa, trehalosa, manosa, maltosa, lactosa, glucosa, rafinosa, celobiosa, gentiobiosa, isomaltosa, arabinosa, glucosamina, fructosa, manitol, sorbitol, compuestos polihidroxi, polisacáridos, dextrano, almidón, hidroxietilalmidón, ciclodextrinas, N-metilpirolideno, celulosa y ácido hialurónico. En algunas modalidades, el estabilizante es sacarosa.

[0019] En algunas modalidades, el estabilizante está presente en la formulación farmacéutica a una concentración entre 2-16 % peso/volumen. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende entre aproximadamente un 8 % y un 10 % de estabilizante peso/volumen. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende al menos 0,005 % peso/volumen, 0,01 % peso/volumen, 0,02 % peso/volumen, 0,03 % peso/volumen, 0,05 % peso/volumen, 0,06 % peso/volumen, 0,07 % peso/volumen, 0,08 % peso/volumen, 0,09 % peso/volumen, 0,1 % peso/volumen, 0,5 % peso/volumen, 0,7 % peso/volumen, 0,8 % peso/volumen, 0,9 % peso/volumen, 1,0 % peso/volumen, 1,2 % peso/volumen, 1,2 % peso/volumen, 1,5 % peso/volumen, 1,7 % peso/volumen, 2 % peso/volumen, 3 % peso/volumen, 4 % peso/volumen, 5 % peso/volumen, 6 % peso/volumen, 7 % peso/volumen, 8 % peso/volumen, 9 % peso/volumen, 10 % peso/volumen, 11 % peso/volumen, 12 % peso/volumen, 13 % peso/volumen, 14 % peso/volumen, 15 % peso/volumen, 16 % peso/volumen, 17 % peso/volumen, 18 % peso/volumen, 18 % peso/volumen, 18 % peso/volumen, 19 % peso/volumen, o 20 % peso/volumen de estabilizante. En algunas modalidades, el estabilizante está presente a una concentración de al menos 8 % peso/volumen.

[0020] En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento no contienen sal.

[0021] También se describen en este documento las formulaciones farmacéuticas liofilizadas elaboradas mediante la liofilización de las formulaciones líquidas descritas en este documento. También se describen en este documento las formulaciones farmacéuticas, en donde la formulación se reconstituye a partir de una formulación liofilizada.

[0022] En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada se reconstituye con agua para inyección estéril. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada se reconstituye con agua para inyección estéril a una concentración final de proteína de 10-100 mg/ml. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada se reconstituye con agua para inyección estéril a una concentración final de proteína de 45-55 mg/ml. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada se reconstituye con agua para inyección estéril a una concentración final de proteína de aproximadamente 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 45 mg/ml, 46 mg/ml, 47 mg/ml, 48 mg/ml, 49 mg/ml, 50 mg/ml, 51 mg/ml, 52 mg/ml, 53 mg/ml, 54 mg/ml, 55 mg/ml, 60 mg/ml, 65 mg/ml, 70 mg/ml, 75

mg/ml mg/ml, 80 mg/ml, 85 mg/ml, 90 mg/ml, 95 mg/ml o 100 mg/ml. En ciertas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa humana está presente en una cantidad de aproximadamente 75 mg/ml o menos. En ciertas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa humana está presente en una cantidad de aproximadamente 50 mg/ml.

[0023] En algunas modalidades, la proteína se proporciona en una formulación farmacéutica liofilizada en un vial. En algunas modalidades, la formulación liofilizada comprende una proteína de fusión de ActRIIa como se define en este documento en una cantidad de 45 mg/vial o 60 mg/vial.

[0024] En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada se reconstituye con agua para inyección estéril. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada se reconstituye con agua para inyección estéril a una concentración final de proteína de aproximadamente 45 mg/ml, 46 mg/ml, 47 mg/ml, 48 mg/ml, 49 mg/ml, 50 mg/ml, 51 mg/ml, 52 mg/ml, 53 mg/ml, 54 mg/ml o 55 mg/ml. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada se reconstituye con agua para inyección estéril hasta una concentración final de proteína de aproximadamente 50 mg/ml.

[0025] En ciertos cuerpos, la formulación liofilizada se reconstituye con aproximadamente 0,5 ml a 1,8 ml de agua para inyección estéril. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada se reconstituye con aproximadamente 0,5 ml, 0,56 ml, 0,58 ml, 0,6 ml, 0,62 ml, 0,64 ml, 0,66 ml, 0,68 ml, 0,70 ml, 0,72 ml, 0,74 ml, 0,76 ml, 0,78 ml, 0,8 ml, 0,8 2 ml, 0,84 ml, 0,86 ml, 0,88 ml, 0,9 ml, 0,9 2 ml, 0,94 ml, 0,96 ml, 0,98 ml, 1 ml, 1,1 ml, 1,15 ml, 1,2 ml, 1,25 ml, 1,3 ml, 1,35 ml, 1,4 ml, 1,45 ml, 1,5 ml, 1,55 ml, 1,6 ml, 1,65 ml, 1,7 ml, 1,75 ml o 1,8 ml de agua para inyección estéril. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada comprende una proteína de fusión de ActRIIa que se proporciona en una cantidad de 45 mg/vial, y la formulación se reconstituye con 0,9 ml, 0,95 ml, 1 ml o 1,1 ml de agua para inyección estéril. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada comprende una proteína de fusión de ActRIIa que se proporciona en una cantidad de 45 mg/vial, y la formulación se reconstituye con 1,1 ml de agua para inyección estéril. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada comprende una proteína de fusión de ActRIIa que se proporciona en una cantidad de 60 mg/vial, y en donde la formulación se reconstituye con 0,90 ml, 0,95 ml, 1,00 ml, 1,05 ml, 1,10 ml, 1,15 ml, 1,20 ml, 1,25 ml, 1,30 ml, 1,35 ml, 1,40 ml, 1,45 ml o 1,50 ml de agua para inyección estéril. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada comprende una proteína de fusión de ActRIIa que se proporciona en una cantidad de 60 mg/vial, y en donde la formulación se reconstituye con 1,30 ml de agua para inyección estéril.

[0026] En ciertas modalidades, la formulación liofilizada se proporciona en una cantidad de 45 mg/vial, y en donde la formulación se reconstituye con entre 0,65 ml y 0,75 ml de agua para inyección estéril. En ciertas modalidades, la formulación liofilizada se proporciona en una cantidad de 60 mg/vial, y en donde la formulación se reconstituye con entre 0,65 ml y 1,75 ml de agua para inyección estéril.

[0027] En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada comprende una proteína de fusión de ActRIIa humana del SEQ ID NO: 32 o una variante del SEQ ID NO: 32 que carece de la lisina C-terminal (SEQ ID NO: 41), un amortiguador, un tensioactivo y un estabilizante, en donde el agente amortiguador se selecciona para que sea fisiológicamente compatible y para mantener un pH de 5,8 cuando se reconstituye con agua para inyección estéril. En ciertas modalidades, el agente amortiguador comprende citrato. En cierta modalidad, el estabilizante es sacarosa. En ciertas modalidades, el tensioactivo es polisorbato 20 o polisorbato 80. En ciertas modalidades, el tensioactivo es polisorbato 80. En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada comprende sotatercept, un amortiguador, un tensioactivo y un estabilizante, en donde el agente amortiguador se selecciona para que sea fisiológicamente compatible y para mantener un pH de 5,8 cuando se reconstituye con agua para inyección estéril

[0028] En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada comprende una proteína de fusión de ActRIIa humana que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32 o que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 41, citrato, polisorbato 80 y sacarosa. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa humana consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:41. En algunas modalidades, la formulación liofilizada comprende una proteína de fusión de ActRIIa humana que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32 y una proteína de fusión de ActRIIa humana que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 41. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada comprende sotatercept.

[0029] En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada comprende 55,0 mg de una proteína de fusión de ActRIIa humana que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32 o una variante del SEQ ID NO: 32 que carece del residuo de lisina C-terminal (p. ej., que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 41), 0,48 mg de ácido cítrico monohidratado, 2,56 mg de citrato trisódico dihidratado, 0,22 mg de polisorbato 80 y 88,0 mg de sacarosa. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa humana consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:41. En algunas modalidades, la formulación liofilizada comprende una proteína de fusión de ActRIIa humana que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32 y una proteína de fusión de ActRIIa humana que comprende la

secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 41. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada comprende sotatercept.

[0030] En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada comprende una proteína de fusión de ActRIIa humana de 72,5 mg del SEQ ID NO: 32 o una variante del SEQ ID NO: 32 que carece del residuo de lisina C-terminal (SEQ ID NO: 41), 0,64 mg de ácido cítrico monohidratado, 3,37 mg de citrato trisódico dihidratado, 0,29 mg de polisorbato 80 y 116,0 mg de sacarosa. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa humana consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:41. En algunas modalidades, la formulación liofilizada comprende una proteína de fusión de ActRIIa humana que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32 y una proteína de fusión de ActRIIa humana que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 41. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada comprende sotatercept.

[0031] En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica reconstituida comprende 50 mg/ml de una proteína ActRIIa humana que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32 o una proteína ActRIIa humana que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:41, citrato 10 mM, polisorbato 80 de 0,2 mg/ml y 80 mg/ml de sacarosa a pH 5,8. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa humana consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:41. En algunas modalidades, la formulación reconstituida comprende una proteína de fusión de ActRIIa humana que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32 y una proteína de fusión de ActRIIa humana que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 41. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica reconstituida comprende sotatercept.

[0032] En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento contienen una mezcla del SEQ ID NO: 32 y una variante del SEQ ID NO: 32 que carece del residuo de lisina C-terminal (SEQ ID NO: 41). En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento contienen una mezcla del SEQ ID NO: 32 y una variante del SEQ ID NO: 32 que carece del residuo de lisina C-terminal (SEQ ID NO: 41) en donde la mezcla contiene 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 %, 80 %, 79 %, 78 %, 77 %, 76 %, 75 %, 74 %, 73 %, 72 %, 71 %, 70 %, 69 %, 68 %, 67 %, 66 %, 65 %, 64 %, 63 %, 62 %, 61 %, 60 %, 59 %, 58 %, 57 %, 56 %, 55 %, 54 %, 53 %, 52 %, 51 %, 50 %, 49 %, 48 %, 47 %, 46 %, 45 %, 44 %, 43 %, 42 %, 41 %, 40 %, 39 %, 38 %, 37 %, 36 %, 35 %, 34 %, 33 %, 32 %, 31 %, 30 %, 29 %, 28 %, 27 %, 26 %, 25 %, 24 %, 23 %, 22 %, 21 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %.

13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % en peso del SEQ ID NO:32.

[0033] En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento contienen una mezcla del SEQ ID NO: 32 y una variante del SEQ ID NO: 32 que carece del residuo de lisina C-terminal (SEQ ID NO: 41) en donde la mezcla contiene aproximadamente 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 %, 80 %, 79 %, 78 %, 77 %, 76 %, 75 %, 74 %, 73 %, 72 %, 71 %, 70 %, 69 %, 68 %, 67 %, 66 %, 65 %, 64 %, 63 %, 62 %, 61 %, 60 %, 59 %, 58 %, 57 %, 56 %, 55 %, 54 %, 53 %, 52 %, 51 %, 50 %, 49 %, 48 %, 47 %, 46 %, 45 %, 44 %, 43 %, 42 %, 41 %, 40 %, 39 %, 38 %, 37 %, 36 %, 35 %, 34 %, 33 %, 32 %, 31 %, 30 %, 29 %, 28 %, 27 %, 26 %, 25 %, 24 %, 23 %, 22 %, 21 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % en peso del SEQ ID NO:32.

[0034] En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento contienen una mezcla del SEQ ID NO: 32 y una variante del SEQ ID NO: 32 que carece del residuo de lisina C-terminal (SEQ ID NO: 41) en donde la mezcla contiene 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 %, 80 %, 79 %, 78 %, 77 %, 76 %, 75 %, 74 %, 73 %, 72 %, 71 %, 70 %, 69 %, 68 %, 67 %, 66 %, 65 %, 64 %, 63 %, 62 %, 61 %, 60 %, 59 %, 58 %, 57 %, 56 %, 55 %, 54 %, 53 %, 52 %, 51 %, 50 %, 49 %, 48 %, 47 %, 46 %, 45 %, 44 %, 43 %, 42 %, 41 %, 40 %, 39 %, 38 %, 37 %, 36 %, 35 %, 34 %, 33 %, 32 %, 31 %, 30 %, 29 %, 28 %, 27 %, 26 %, 25 %, 24 %, 23 %, 22 %, 21 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % en peso del SEQ ID NO:41.

[0035] En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento contienen una mezcla del SEQ ID NO: 32 y una variante del SEQ ID NO: 32 que carece del residuo de lisina C-terminal (SEQ ID NO: 41) en donde la mezcla contiene aproximadamente 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 %, 80 %, 79 %, 78 %, 77 %, 76 %, 75 %, 74 %, 73 %, 72 %, 71 %, 70 %, 69 %, 68 %, 67 %, 66 %, 65 %, 64 %, 63 %, 62 %, 61 %, 60 %, 59 %, 58 %, 57 %, 56 %, 55 %, 54 %, 53 %, 52 %, 51 %, 50 %, 49 %, 48 %, 47 %, 46 %, 45 %, 44 %, 43 %, 42 %, 41 %, 40 %, 39 %, 38 %, 37 %, 36 %, 35 %, 34 %, 33 %, 32 %, 31 %, 30 %, 29 %, 28 %, 27 %, 26 %, 25 %, 24 %, 23 %, 22 %, 21 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % en peso del SEQ ID NO: 41. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento contienen el 100 % del SEQ ID NO: 41 en peso.

[0036] En algunas modalidades, la formulación farmacéutica se administra por vía parenteral (p. ej., por infusión intravenosa). En algunas modalidades, la formulación farmacéutica se administra mediante inyección subcutánea. En ciertas modalidades, la formulación está contenida en un vial de vidrio o dispositivo de inyección.

[0037] También se describen en este documento métodos para tratar la hipertensión arterial pulmonar (HAP), que comprenden la administración a un paciente que la necesita de una formulación farmacéutica descrita en este documento.

[0038] También se describen en este documento los usos de una formulación farmacéutica para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar (HAP), que comprende la administración a un paciente que la necesita de la formulación farmacéutica descrita en este documento.

[0039] En algunas modalidades, la descripción proporciona una formulación farmacéutica liofilizada para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar en un sujeto que la necesita y que comprende una proteína de fusión de ActRIIa humana del SEQ ID NO: 32, citrato, polisorbato 80 y sacarosa, en donde la formulación está liofilizada. En algunas modalidades, el vial comprende una formulación farmacéutica liofilizada que comprende una proteína de fusión de ActRIIa humana del SEQ ID NO: 32, ácido cítrico monohidrato, citrato trisódico dihidratado, polisorbato 80 y sacarosa, en donde la formulación está liofilizada. En algunas modalidades, el vial comprende una formulación farmacéutica liofilizada que comprende 55 mg de la proteína (es decir, proteína de fusión de ActRIIa), 0,48 mg de ácido cítrico monohidratado, 2,56 mg de citrato trisódico dihidratado, 0,22 mg de polisorbato 80 y 88,0 mg de sacarosa, en donde la formulación está liofilizada. En algunas modalidades, el vial comprende una formulación farmacéutica liofilizada que comprende 72,5 mg de proteína de fusión de ActRIIa, 0,64 mg de ácido cítrico monohidratado, 3,37 mg de citrato trisódico dihidratado, 0,29 mg de polisorbato 80 y 116,0 mg de sacarosa, en donde la formulación está liofilizada. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa humana es una variante del SEQ ID NO: 32 que carece de la lisina C-terminal. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa humana comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:41. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa humana es sotatercept.

[0040] En algunas modalidades, una vez reconstituido con agua estéril, el vial comprende 50 mg/ml de la proteína de fusión de ActRIIa que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32, citrato 10 mM, 0,02 mg/ml de polisorbato 80 y 8 % en peso de sacarosa. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa humana comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 41, citrato 10 mM, polisorbato 80 de 0,2 mg/ml y 8 % en peso de

sacarosa. En algunas modalidades, una vez reconstituido con agua estéril, el vial comprende 50 mg/ml de sotatercept, 10 mM de citrato, 0,2 mg/ml de polisorbato 80 y 8 % en peso de sacarosa.

[0041] En algunas modalidades, la formulación farmacéutica reconstituida comprende 50 mg/ml de una proteína de fusión de ActRIIa que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32, citrato 10 mM, 0,02 mg/ml de polisorbato 80 y 80 mg/ml de sacarosa a pH 5,8. En algunas modalidades, la proteína ActRIIa humana comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 41, citrato 10 mM, 0,02 mg/ml de polisorbato 80 y sacarosa de 80 mg/ml a pH 5,8. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica reconstituida comprende 50 mg/ml de sotatercept, 10 mM de citrato, 0,02 mg/ml de polisorbato 80 y 80 mg/ml de sacarosa a pH 5,8.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0042] La **Figura 1** muestra los componentes de un kit que comprende una formulación farmacéutica liofilizada que comprende una proteína de fusión de ActRIIa y un dispositivo de inyección. Un vial (1) contiene una formulación farmacéutica liofilizada que comprende una proteína de fusión de ActRIIa, una solución inyectable estéril reconstituida o una solución inyectable estéril. Se utiliza una jeringa precargada (2) que contiene una solución de reconstitución para reconstituir una formulación farmacéutica liofilizada que comprende una proteína de fusión de ActRIIa de (1) en una solución inyectable estéril. Un adaptador de vial (3) acopla el vial (1) a la jeringa precargada (2) mediante la conexión al vial en un extremo y la conexión a la jeringa precargada en un extremo opuesto. Se proporciona una jeringa (4) y una aguja (5) para la administración de una solución inyectable estéril. Se proporcionan toallitas húmedas (6) para la esterilización de componentes individuales del kit.

[0043] La **Figura 2** muestra una alineación de secuencias múltiples de varias proteínas ActRIIa de vertebrados y ActRIIa humanas (SEQ ID NOs: 62-68).

Las **figuras 3A y 3B** muestran la purificación de ActRIIa-hFc expresada en células CHO. La proteína se purifica como un pico único y bien definido, como se visualiza mediante la columna de dimensionamiento (panel superior) y el SDS-PAGE teñido con Coomassie (panel inferior) (carril izquierdo: estándares de peso molecular; carril derecho: ActRIIa-hFc).

Las **figuras 4A y 4B** muestran la unión de ActRIIa-hFc a la activina (panel superior) y GDF-11 (panel inferior), según lo medido por el ensayo Biacore™.

[0044] La **Figura 5** muestra el efecto del pH y el amortiguador en el % de especies de monómeros por HP-SEC después de 6M a 25 °C.

[0045] **Figura 6** muestra el efecto del pH y el amortiguador sobre la actividad de unión mediante BiacoreTM después de una estabilidad de 6M a 25 °C.

[0046] **La Figura 7** muestra el efecto sobre la estabilidad del amortiguador y el pH en el % de HMW, monómero y % de especies de LMW por HP-SEC después de 3 meses.

[0047] **La Figura 8** muestra el efecto del pH y el amortiguador sobre la estabilidad en el pico de % menor y el % mayor mediante CE-SDS NR después de 1 mes.

[0048] **La Figura 9** muestra el efecto del pH y el amortiguador sobre la estabilidad en el % ácido, el % de especies básicas y el % de especies principales totales por icIEF desialilado después de 3 meses.

[0049] **Figura 10** muestra el efecto de la concentración en % de especies de monómeros por HP-SEC.

[0050] **La Figura 11** muestra el efecto del amortiguador y la concentración sobre la estabilidad en el % de especies de monómeros por HP-SEC.

[0051] **La Figura 12** muestra el efecto de la concentración de proteínas y sacarosa en la pureza mediante HP-SEC en la estabilidad.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

[0052] Los términos utilizados en esta especificación generalmente tienen sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de esta descripción y en el contexto específico donde se usa cada término. Ciertos términos se analizan a continuación o en otra parte de la descripción, para proporcionar orientación adicional al profesional en la descripción de las formulaciones y métodos de la descripción y cómo hacerlas y usarlas. El alcance o significado de cualquier uso de un término será evidente en el contexto específico en el que se usa el término.

[0053] "Cerca de" y "aproximadamente" significarán generalmente un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las mediciones. Por lo general, los grados de error ejemplares están dentro del 20 por ciento (%), preferiblemente dentro del 10 % y más preferiblemente dentro del 5 % de un valor o rango de valores determinados.

[0054] Alternativamente, y particularmente en los sistemas biológicos, los términos "aproximadamente" y "aproximadamente" pueden significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 5 veces y más preferiblemente dentro de 2 veces de un valor dado. Las cantidades numéricas dadas en este documento son aproximadas a menos que se indique lo contrario, lo que significa que el término "aproximadamente" o "aproximadamente" se puede inferir cuando no se indique expresamente.

[0055] Los términos "uno" y "una" incluyen referentes plurales a menos que el contexto en el que se usa el término dicte claramente lo contrario. Los términos "un" (o "una"), así como los términos "uno o más" y "al menos uno" se pueden usar indistintamente en este documento. Además, "y/o", cuando se utilice en este documento, debe tomarse como una descripción específica de cada una de las dos o más características o componentes especificados con o sin el otro. Por lo tanto, el término "y/o" tal como se usa en una frase como "A y/o B" en este documento tiene la intención de incluir "A y B", "A o B", "A" (solo) y "B" (solo). Del mismo modo, el término "y/o" tal como se usa en una frase como "A, B y/o C" tiene la intención de abarcar cada uno de los siguientes aspectos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

[0056] Los rangos numéricos que se describen en este documento incluyen los números que definen los rangos. Por ejemplo, un pH entre 5,0 y 7,0 incluye un pH de 5,0 y un pH de 7,0 y valores entre 5,0 y 7,0.

[0057] Una proteína descrita en este documento puede comprender una secuencia de aminoácidos que no se produce de forma natural. Tales variantes necesariamente tienen menos del 100 % de identidad de secuencia o similitud con la molécula inicial. En ciertas modalidades, la variante tendrá una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 75 % a menos del 100 % de identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la proteína inicial (p. ej., natural o de tipo silvestre), más preferiblemente de aproximadamente 80 % a menos de 100 %, más preferiblemente de aproximadamente 85 % a menos de 100 %, más preferiblemente de aproximadamente 90 % a menos de 100 % (p. ej., 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %) y más preferiblemente de aproximadamente 95 % a menos del 100 %, p. ej., a lo largo de la molécula variante.

Formulaciones farmacéuticas

[0058] En el presente documento se proporcionan formulaciones farmacéuticas que comprenden una proteína de fusión recombinante que comprende un dominio extracelular (ECD) de proteínas del receptor de activina tipo IIA humano (ActRIIa) o derivados de las mismas unidas a un dominio constante de una inmunoglobulina, como el dominio Fc de IgG1 humana, en donde las formulaciones farmacéuticas están liofilizadas. En ciertos aspectos, la descripción se refiere a una formulación farmacéutica que comprende un dominio extracelular (ECD) de una proteína ActRIIa humana o un derivado de la misma unido a un dominio constante de una inmunoglobulina, como el dominio Fc de IgG1 humana, en donde la formulación farmacéutica se reconstituye a partir de una formulación liofilizada en una solución estéril para inyección.

[0059] En ciertos aspectos, la descripción se refiere a una formulación farmacéutica liofilizada que comprende un dominio extracelular (ECD) de la proteína ActRIIa humana o un derivado de la misma unido a un dominio constante de una inmunoglobulina, como un dominio Fc de IgG1 humana, para su reconstitución en una solución estéril para inyección. Durante la liofilización, una formulación líquida pasa de estar en una fase acuosa a estar en una fase sólida amorfa, lo que se cree que protege a la proteína de la inestabilidad química y/o conformacional. La liofilización se lleva a cabo utilizando técnicas comunes en la técnica y las formulaciones liofilizadas están optimizadas para la estabilidad, la vida útil y la disminución de los niveles de especies y agregados de alto peso molecular (HMW). Tang et al., Pharm Res. 21: 191-200, (2004) y Chang et al., Pharm Res. 13: 243-9 (1996). Las formulaciones farmacéuticas ayudaron a estabilizar la proteína contra las tensiones de la fabricación, el envío y el almacenamiento. Los excipientes y aditivos utilizados en las formulaciones liofilizadas son componentes integrales de una formulación y, por lo tanto, deben ser seguros y bien tolerados por los pacientes. Para los medicamentos proteicos, la elección de excipientes y aditivos es particularmente importante porque pueden afectar tanto la eficacia como la inmunogenicidad del medicamento. Los excipientes y aditivos también son útiles para reducir la viscosidad de las formulaciones de proteínas de alta concentración para permitir su administración y mejorar la comodidad del paciente. La formulación, los excipientes y los aditivos descritos en este documento proporcionan estabilidad contra estas tensiones. Los excipientes comunes se conocen en la técnica y se pueden encontrar en Powell et al., Compendium of Excipients for Parenteral Formulations (1998), PDA J. Pharm. Sci. Technology, 52: 238-311.

[0060] En otro aspecto, se proporcionan formulaciones farmacéuticas que comprenden una proteína de fusión de ActRIIa. En algunas modalidades, la formulación está liofilizada. En modalidades posteriores, la formulación se reconstituye a partir de una formulación liofilizada. En ciertas modalidades, la descripción proporciona una formulación farmacéutica que comprende una proteína ActRIIa en donde la formulación farmacéutica está en forma liofilizada en un vial. En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica comprende entre 15 mg y 100 mg de proteína de fusión de ActRIIa. En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica comprende entre 20 mg y 80 mg de proteína de fusión de ActRIIa. En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica comprende entre 40 mg y 70 mg de proteína de fusión de ActRIIa. En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica comprende aproximadamente 15 mg, aproximadamente 17,5 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 22,5 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 27,5 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 32,5 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 37,5 mg,

aproximadamente 40 mg, aproximadamente 42,5 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 47,5 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 52,5 mg, aproximadamente 55 mg, aproximadamente 57,5 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 62,5 mg, aproximadamente 65 mg, aproximadamente 67,5 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 72,5 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 77,5 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 82,5 mg, aproximadamente 85 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 92,5 mg, aproximadamente 95 mg, aproximadamente 97,5 mg o aproximadamente 100 mg de la proteína de fusión de ActRIIa.

[0061] En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada que comprende una proteína de fusión de ActRIIa se proporciona como un polvo liofilizado o una torta en un vial. En modalidades específicas, la formulación farmacéutica liofilizada comprende una proteína de fusión de ActRIIa en una cantidad de 45 mg/vial o 60 mg/vial. En modalidades más específicas, cada uno de dichos 45 mg/vial o dichos 60 mg/vial se reconstituye con agua para inyección estéril, cada uno de los cuales contiene una concentración final de 45 a 55 mg/ml de la proteína de fusión de ActRIIa reconstituida. En una modalidad más específica, cada uno de dichos 45 mg/vial o dichos 60 mg/vial se reconstituye con agua para inyección estéril, cada uno de los cuales contiene una concentración final de 50 mg/ml de la proteína de fusión de ActRIIa reconstituida (ingrediente farmacéutico activo).

[0062] En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada comprende una proteína de fusión de ActRIIa en una cantidad de 45 mg/vial o 60 mg/vial, y se reconstituye con agua para inyección estéril. En una modalidad más específica, la formulación farmacéutica liofilizada proporcionada en cada uno de dichos 45 mg/vial o dichos 60 mg/vial se reconstituye con agua para inyección estéril a una concentración final de aproximadamente 45 mg/ml, 46 mg/ml, 47 mg/ml, 48 mg/ml, 49 mg/ml, 50 mg/ml, 51 mg/ml, 52 mg/ml, 53 mg/ml, 54 mg/ml o 55 mg/ml de la proteína de fusión de ActRIIa reconstituida. En una modalidad más específica, la formulación farmacéutica liofilizada proporcionada en cada uno de dichos 45 mg/vial o dichos 60 mg/vial se reconstituye con agua para inyección estéril a una concentración final de 45 mg/ml, 46 mg/ml, 47 mg/ml, 48 mg/ml, 49 mg/ml, 50 mg/ml, 51 mg/ml, 52 mg/ml, 53 mg/ml, 54 mg/ml o 55 mg/ml de la proteína de fusión de ActRIIa reconstituida. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada proporcionada en cada uno de dichos 45 mg/vial o dichos 60 mg/vial se reconstituye con agua para inyección estéril a una concentración final de aproximadamente 50 mg/ml de la proteína de fusión de ActRIIa reconstituida. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada proporcionada en cada uno de dichos 45

mg/vial o dichos 60 mg/vial se reconstituye con agua para inyección estéril a una concentración final de 50 mg/ml de la proteína de fusión de ActRIIa reconstituida.

[0063] En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada proporcionada en cada uno de dichos 45 mg/vial o dichos 60 mg/vial se reconstituye con 0,5 a 2 ml de agua para inyección estéril. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada en cada uno de dichos 45 mg/vial o dichos 60 mg/vial se reconstituye con aproximadamente 0,5 ml, 0,56 ml, 0,58 ml, 0,6 ml, 0,62 ml, 0,64 ml, 0,66 ml, 0,68 ml, 0,70 ml, 0,72 ml, 0,74 ml, 0,76 ml, 0,78 ml, 0,8 ml, 0,8 2 ml, 0,84 ml, 0,86 ml, 0,88 ml, 0,9 ml, 0,9 2 ml, 0,94 ml, 0,96 ml, 0,98 ml, 1 ml, 1,1 ml, 1,15 ml, 1,2 ml, 1,25 ml, 1,3 ml, 1,35 ml, 1,4 ml, 1,45 ml, 1,5 ml, 1,55 ml, 1,6 ml, 1,65 ml, 1,7 ml, 1,75 ml o 1,8 ml de agua para inyección estéril. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada proporcionada en cada uno de dichos 45 mg/vial o dichos 60 mg/vial se reconstituye con 0,5 ml, 0,55 ml, 0,56 ml, 0,57 ml, 0,58 ml, 0,59 ml, 0,6 ml, 0,65 ml, 0,66 ml, 0,67 ml, 0,68 ml, 0,69 ml, 0,70 ml, 0,71 ml, 0,72 ml, 0,73 ml, 0,74 ml, 0,75 ml, 0,76 ml, 0,77 ml, 0,78 ml, 0,79 ml, 0,8 ml, 0,85 ml, 0,9 ml, 0,95 ml, 1 ml, 1,1 ml, 1,15 ml, 1,2 ml, 1,25 ml, 1,3 ml, 1,35 ml, 1,4 ml, 1,45 ml, 1,5 ml, 1,51 ml, 1,52 ml, 1,53 ml, 1,54 ml, 1,55 ml, 1,56 ml, 1,57 ml, 1,58 ml, 1,59 ml, 1,6 ml, 1,61 ml, 1,62 ml, 1,63 ml, 1,64 ml, 1,65 ml, 1,66 ml, 1,67 ml, 1,68 ml, 1,69 ml, 1,7 ml, 1,71 ml, 1,72 ml, 1,73 ml, 1,74 ml, 1,75 ml, 1,76 ml, 1,77 ml, 1,78 ml, 1,79 ml o 1,8 ml de agua para inyección estéril. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada proporcionada en dichos 45 mg/vial se reconstituye con 0,8 ml, 0,85 ml, 0,9 ml, 0,95 ml, 1 ml, 1,1 ml, 1,15 ml, 1,2 ml, 1,25 ml, 1,3 ml, 1,35 ml o 1,4 ml 0,75 ml de agua para inyección estéril. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada proporcionada en dichos 45 mg/vial se reconstituye con 0,9 ml, 0,95 ml, 1 ml o 1,1 ml de agua para inyección estéril. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada proporcionada en dichos 45 mg/vial se reconstituye con 1,1 ml de agua para inyección estéril. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada proporcionada en dichos 60 mg/vial se reconstituye con 0,8 ml, 0,85 ml, 0,9 ml, 0,95 ml, 1 ml, 1,1 ml, 1,15 ml, 1,2 ml, 1,25 ml, 1,3 ml, 1,35 ml o 1,4 ml 0,75 ml de agua para inyección estéril. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada proporcionada en dichos 60 mg/vial se reconstituye con 1 ml, 1,1 ml, 1,2 ml o 1,3 ml de agua para inyección estéril. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada proporcionada en dichos 60 mg/vial se reconstituye con 1,3 ml de agua para inyección estéril.

[0064] En algunas modalidades, las formulaciones farmacéuticas liofilizadas proporcionadas en este documento comprenden una proteína de fusión de ActRIIa y uno o más aditivos farmacéuticos y/o excipientes. En ciertas modalidades, uno o más aditivos farmacéuticos y/o excipientes comprenden un amortiguador, un estabilizante y un tensioactivo. Se pueden

seleccionar agentes amortiguadores para mantener el pH de la formulación durante el procesamiento y en la reconstitución. Los estabilizantes pueden incluir crioprotectores y lioprotectores, como polioles, azúcares y polisacáridos, y pueden seleccionarse para proteger la formulación de las tensiones del ciclo de congelación/descongelación y estabilizar la formulación en estado liofilizado. Los tensioactivos pueden seleccionarse en función de su capacidad para servir como emulsionante, humectante, solubilizante y/o dispersante.

[0065] Las formulaciones proporcionadas en este documento comprenden agentes amortiguadores, tensioactivos y azúcares, que se describen con mayor detalle a continuación.

[0066] Una persona medianamente versada en la técnica reconocería que las concentraciones de los excipientes descritos en este documento comparten una interdependencia dentro de una formulación particular. A modo de ejemplo, la concentración de un agente de carga se reduce, en un aspecto, donde, p. ej., hay una alta concentración de proteínas. Se agregan excipientes y otros aditivos para impartir o mejorar la capacidad de fabricación y/o la calidad del producto final, como la estabilidad y la administración de un producto farmacéutico (p. ej., proteína). Las formulaciones proporcionadas en este documento comprenden excipientes adecuados que mejoran la estabilidad y la seguridad.

Agentes amortiguadores

[0067] Por lo general, se observa que la estabilidad de una formulación de proteína farmacológicamente activa es máxima en un rango estrecho de pH. Este rango de pH de estabilidad óptima debe identificarse temprano durante los estudios previos a la formulación. Varios enfoques, como los estudios de estabilidad acelerada y los estudios de cribado calorimétrico, son útiles en este esfuerzo (Remmele R. L. Jr., et al., *Biochemistry*, 38(16): 5241-7 (1999)). Una vez finalizada una formulación, la proteína debe fabricarse y mantenerse durante toda su vida útil. Por lo tanto, los agentes amortiguadores casi siempre se emplean para controlar el pH en la formulación.

[0068] Se deben considerar varios factores al elegir un agente amortiguador. En primer lugar, la especie amortiguador y su concentración deben definirse en función de su pKa y el pH de la formulación deseada. Igualmente importante es asegurarse de que el amortiguador sea compatible con la proteína y otros excipientes de la formulación, y no catalice ninguna reacción de degradación. Un tercer aspecto importante a considerar es la sensación de escozor e irritación que el amortiguador puede inducir durante la administración. El potencial de escozor e irritación es mayor para los medicamentos que se administran por vía subcutánea (SC) o intramuscular (IM), donde la solución del fármaco permanece en el sitio durante un período de tiempo relativamente más largo que cuando se administra por vía intravenosa, donde la formulación se

diluye rápidamente en la sangre tras la administración. Para las formulaciones que se administran por infusión intravenosa directa, se debe controlar la cantidad total de amortiguador (y cualquier otro componente de la formulación).

[0069] Los tampones para formulaciones liofilizadas requieren una consideración adicional. Por ejemplo, tampones particulares como el fosfato de sodio tienen una propensión a cristalizar fuera de la fase amorfa de proteínas durante la congelación, lo que resulta en cambios en el pH. En ciertas modalidades, los agentes amortiguadores ejemplares utilizados para amortiguar las formulaciones farmacéuticas como se establece en este documento incluyen, entre otros, ácidos orgánicos, succinato, fosfato, acetato, citrato, Tris, HEPES y aminoácidos o mezclas de aminoácidos, incluidos, entre otros, aspartato, arginina y glicina. En algunas modalidades, el agente amortiguador comprende citrato trisódico dihidratado. En algunas modalidades, el agente amortiguador comprende ácido cítrico monohidratado. En algunas modalidades, el agente amortiguador comprende citrato. En una modalidad, el agente amortiguador comprende citrato trisódico dihidrato y ácido cítrico monohidratado. En otra modalidad, los agentes amortiguadores son citrato trisódico dihidrato y ácido cítrico monohidratado. En ciertas modalidades, en donde la proteína tiene una carga negativa debido a la presencia de glicanos, el amortiguador no es histidina. En algunas modalidades, el amortiguador comprende citrato, succinato o histidina.

[0070] En ciertas modalidades, la cantidad de amortiguador en la formulación liofilizada está entre 0,3 mg y 5 mg. En ciertas modalidades, la cantidad de amortiguador en la formulación liofilizada es de 0,3 mg, 0,4 mg, 0,5 mg, 1,0 mg, 1,5 mg, 2,0 mg, 2,5 mg, 3,0 mg, 3,5 mg, 4,0 mg, 4,5 mg o 5,0 mg. En ciertas modalidades, la cantidad de amortiguador en la formulación liofilizada es de aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 1,0 mg, aproximadamente 1,5 mg, aproximadamente 2,0 mg, aproximadamente 2,5 mg, aproximadamente 3,0 mg, aproximadamente 3,5 mg, aproximadamente 4,0 mg, aproximadamente 4,5 mg o aproximadamente 5,0 mg.

[0071] En ciertas modalidades, el amortiguador comprende ácido cítrico monohidratado y citrato trisódico dihidratado, en donde la cantidad de ácido cítrico monohidratado está entre 0,1 mg y 1,0 mg. En ciertas modalidades, la cantidad de ácido cítrico monohidratado es 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,4 mg, 0,5 mg, 0,6 mg, 0,7 mg, 0,8 mg, 0,9 mg o 1,0 mg. En ciertas modalidades, la cantidad de ácido cítrico monohidratado es de aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 0,2 mg, aproximadamente 0,3 mg, aproximadamente 0,4 mg, aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 0,6 mg, aproximadamente 0,7 mg, aproximadamente 0,8 mg, aproximadamente 0,9 mg o aproximadamente 1,0 mg. En ciertas modalidades, la cantidad de ácido cítrico monohidratado es de 0,48 mg. En ciertas modalidades, la cantidad de ácido cítrico

monohidratado es de 0,48 mg. En ciertas modalidades, la cantidad de ácido cítrico monohidratado es de 0,48 mg. En ciertas modalidades, la cantidad de ácido cítrico monohidratado es de 0,64 mg.

[0072] En ciertas modalidades, el amortiguador comprende ácido cítrico monohidrato y citrato trisódico dihidratado, en donde la cantidad de citrato trisódico dihidratado está entre 1,0 mg y 5,0 mg. En ciertas modalidades, la cantidad de citrato de trisodio dihidratado es de 1,0 mg, 2,0 mg, 2,5 mg, 3,0 mg, 4,0, mg o 5,0 mg. En ciertas modalidades, la cantidad de citrato trisódico dihidratado es de aproximadamente 1,0 mg, aproximadamente 2,0 mg, aproximadamente 2,5 mg, aproximadamente 3,0 mg, aproximadamente 4,0, mg o aproximadamente 5,0 mg. En ciertas modalidades, la cantidad de citrato de trisodio dihidratado es de 2,56 mg. En ciertas modalidades, la cantidad de citrato trisódico dihidratado es de 3,37 mg.

[0073] En una modalidad, el agente amortiguador presente en la formulación se selecciona para que sea fisiológicamente compatible y para mantener un pH deseado de la formulación farmacéutica cuando se reconstituye con agua para inyección estéril. En otra modalidad, el pH de la solución está por encima de 2. En otra modalidad, el pH de la solución está entre pH 2,0 y pH 12,0. Por ejemplo, en varias modalidades, el pH de la solución reconstituida es 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0. En algunas modalidades, el pH de la solución está entre pH 5 y pH 7 cuando se reconstituye en solución. En algunas modalidades, el pH de la solución reconstituida es 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 o 7,0. En una modalidad, el pH de la solución reconstituida es $\leq 6,5$. En una modalidad, el pH de la solución reconstituida es de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. En una modalidad, el pH de la solución reconstituida es de aproximadamente 5,3 a aproximadamente 6,3. En una modalidad, el pH de la solución reconstituida es $\leq 6,5$. En una modalidad, el pH de la solución reconstituida es de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,5. En una modalidad, el pH de la solución reconstituida es 5,8.

[0074] En algunas modalidades, el amortiguador comprende citrato y el pH de la solución reconstituida es de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. En algunas modalidades, el amortiguador comprende citrato y el pH de la solución reconstituida es de aproximadamente 5,3 a aproximadamente 6,3. En algunas modalidades, el amortiguador comprende citrato y el pH de la solución reconstituida es de aproximadamente 5,8.

[0075] En algunas modalidades, el amortiguador comprende succinato y el pH de la solución reconstituida es de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. En algunas modalidades, el

amortiguador comprende succinato y el pH de la solución reconstituida es de aproximadamente 5,3 a aproximadamente 6,3. En algunas modalidades, el amortiguador comprende succinato y el pH de la solución reconstituida es de aproximadamente 5,8.

[0076] El compuesto amortiguador de pH puede estar presente en cualquier cantidad adecuada para mantener el pH de la formulación en un nivel predeterminado. Cuando se utilizan niveles adecuadamente bajos de amortiguador, se pueden evitar la cristalización y los cambios de pH. En una modalidad, la concentración del agente amortiguador está entre 0,1 mM y 500 mM (1 M). Por ejemplo, se contempla que el agente amortiguador sea al menos 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 o 500 mM. En ciertas modalidades, el agente amortiguador es 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 o 500 mM. En una modalidad, la concentración del agente amortiguador está entre 0,1 mM y 20 mM. En ciertas modalidades, el agente amortiguador es 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 mM. En ciertas modalidades, el agente amortiguador está presente en una cantidad 10 mM.

[0077] En algunas modalidades, el agente amortiguador es 10 mM de un amortiguador de citrato que mantiene un pH de la formulación farmacéutica a un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente pH 6,5. En algunas modalidades, el agente amortiguador es 10 mM de un amortiguador de succinato que mantiene un pH de la formulación farmacéutica a un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente pH 6,5. En algunas modalidades, el agente amortiguador es 10 mM de un amortiguador de histidina que mantiene un pH de la formulación farmacéutica a un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente pH 6,0. En algunas modalidades, el agente amortiguador es 10 mM de un amortiguador de citrato que mantiene un pH de la formulación farmacéutica a un pH de aproximadamente 5,8. En algunas modalidades, el agente amortiguador es 10 mM de un amortiguador de succinato que mantiene un pH de la formulación farmacéutica a un pH de aproximadamente 5,8.

[0078] En algunas modalidades, el agente amortiguador comprende citrato trisódico dihidratado. En algunas modalidades, el agente amortiguador comprende ácido cítrico monohidrato. En algunas modalidades, el agente amortiguador comprende citrato. En algunas modalidades, el agente amortiguador comprende citrato trisódico dihidrato y ácido cítrico monohidratado. En ciertas modalidades, la proteína tiene una carga negativa debido a la presencia de glicanos y el amortiguador no es histidina. En algunas modalidades, el agente amortiguador está presente en la formulación farmacéutica a una concentración de al menos 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20,

25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, o 500 mM. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende al menos 10 mM de agente amortiguador.

Estabilizantes

[0079] En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en este documento comprenden estabilizantes. Estos estabilizantes se pueden clasificar en función de los mecanismos por los cuales estabilizan las proteínas contra diversas tensiones químicas y físicas. Algunos estabilizantes se utilizan para aliviar los efectos de un estrés específico o para regular una susceptibilidad particular de una proteína específica. Otros estabilizantes tienen efectos más generales sobre las estabilidades físicas y covalentes de las proteínas. Dadas las enseñanzas y la orientación proporcionadas en este documento, los expertos en la técnica sabrán qué cantidad o rango de estabilizante se puede incluir en cualquier formulación en particular para lograr una formulación de la descripción que probablemente promueva la retención y estabilidad de la proteína ActRIIa.

[0080] En algunas modalidades, se añade un estabilizante (o una combinación de estabilizantes) a la formulación para prevenir o reducir la agregación inducida por el almacenamiento y la degradación química. Una solución opaca o turbia en el momento de la reconstitución normalmente indica que la proteína se ha precipitado o al menos agregado. Los estabilizantes son capaces de prevenir la agregación o degradación química (p. ej., autólisis, desamidación, oxidación, etc.). Algunos estabilizantes también son capaces de actuar como anticoagulantes tras la administración de la formulación a un paciente. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en este documento incluyen estabilizantes que incluyen, entre otros, sacarosa, trehalosa, manosa, maltosa, lactosa, glucosa, rafinosa, celobiosa, gentiobiosa, isomaltosa, arabinosa, glucosamina, fructosa, manitol, sorbitol, compuestos polihidroxi, incluidos polisacáridos como dextrano, almidón, hidroxietilalmidón, ciclodextrinas, N-metilpirolideno, celulosa y ácido hialurónico (Carpenter et al., Develop. Biol. Standard 74: 225, (1991)). En una modalidad de la descripción, la sacarosa se utiliza como estabilizante.

[0081] En ciertas modalidades, las formulaciones liofilizadas descritas en este documento contienen un estabilizante en una cantidad entre 50 mg y 150 mg. En ciertas modalidades, las formulaciones liofilizadas descritas en este documento contienen un estabilizante en una cantidad de 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 110 mg, 120 mg, 130 mg, 140 mg o 150 mg. En ciertas modalidades, las formulaciones liofilizadas descritas en este documento contienen un estabilizante en una cantidad de aproximadamente 50 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente

100 mg, aproximadamente 110 mg, aproximadamente 120 mg, aproximadamente 130 mg, aproximadamente 140 mg o aproximadamente 150 mg.

[0082] En ciertas modalidades, el estabilizante es sacarosa en la cantidad de 88,0 mg. En ciertas modalidades, el estabilizante es sacarosa en la cantidad de 116,0 mg.

[0083] En ciertas modalidades, la formulación reconstituida comprende un estabilizante a una concentración de aproximadamente 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 700, 900 o 1000 mM. Del mismo modo, en ciertas modalidades de la descripción, el estabilizante se incorpora en una concentración de aproximadamente 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 % en peso/volumen.

[0084] En algunas modalidades, la formulación comprende aproximadamente del 8 % al 10 % de sacarosa en peso/volumen. En algunas modalidades, la formulación comprende 8-10 % en peso/volumen de sacarosa. En algunas modalidades, la formulación comprende sacarosa al 8 %, 9 % o 10 % en peso/volumen. En algunas modalidades, la formulación comprende sacarosa al 8 % en peso/volumen.

Tensioactivos

[0085] En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en este documento pueden incluir adicionalmente tensioactivos. Los tensioactivos se utilizan comúnmente en formulaciones de proteínas para evitar la degradación inducida por la superficie. Los tensioactivos son moléculas anfipáticas con la capacidad de superar a las proteínas por posiciones interfaciales (y/o promover el repliegue adecuado de una molécula de proteína estructuralmente alterada). Las porciones hidrofóbicas de las moléculas de tensioactivo ocupan posiciones interfaciales (p. ej., aire/líquido), mientras que las porciones hidrofílicas de las moléculas permanecen orientadas hacia el disolvente a granel. A concentraciones suficientes (generalmente aproximadamente la concentración micelar crítica del detergente), una capa superficial de moléculas de tensioactivo sirve para evitar que las moléculas de proteína se adsorban en la interfaz. De este modo, se minimiza la degradación inducida por la superficie. Los tensioactivos contemplados en este documento incluyen, entre otros, ésteres de ácidos grasos de polietoxilatos de sorbitán, es decir, polisorbato 20 y polisorbato 80. Los dos difieren solo en la longitud de la cadena alifática que imparte carácter hidrofóbico a las moléculas, C-12 y C-18, respectivamente. En consecuencia, el polisorbato-80 es más tensioactivo y tiene una concentración micelar crítica más baja que el polisorbato-20.

[0086] Los detergentes también pueden afectar la estabilidad conformacional termodinámica de las proteínas. Los tensioactivos no iónicos son generalmente útiles en la estabilización de proteínas. Los tensioactivos iónicos (detergentes) normalmente desestabilizan las proteínas. Una vez más, los efectos de un determinado excipiente detergente serán específicos de la proteína. Por ejemplo, se ha demostrado que los polisorbato reducen la estabilidad de algunas proteínas y aumentan la estabilidad de otras. La desestabilización de proteínas con detergente se puede racionalizar en términos de las colas hidrofóbicas de las moléculas de detergente que pueden unirse específicamente con estados proteicos parcial o totalmente desplegados. Estos tipos de interacciones podrían causar un cambio en el equilibrio conformacional hacia los estados proteicos más expandidos (es decir, aumentar la exposición de porciones hidrofóbicas de la molécula de proteína en complemento al polisorbato de unión). Alternativamente, si el estado nativo de la proteína exhibe algunas superficies hidrofóbicas, la unión del detergente al estado nativo puede estabilizar esa conformación. Otro aspecto de los polisorbato es que son inherentemente susceptibles a la degradación oxidativa. A menudo, como materias primas, contienen cantidades suficientes de peróxidos para provocar la oxidación de las cadenas laterales de residuos de proteínas, especialmente la metionina. El potencial de daño oxidativo que surge de la adición de estabilizante enfatiza el punto de que se deben usar las concentraciones efectivas más bajas de excipientes en las formulaciones. Para los tensioactivos, la concentración efectiva de una proteína determinada dependerá del mecanismo de estabilización.

[0087] Los tensioactivos también se agregan en cantidades adecuadas para prevenir el fenómeno de agregación relacionado con la superficie durante la congelación y el secado (Chang, B, J. Pharm. Sci. 85: 1325, (1996)). Por lo tanto, los tensioactivos ejemplares incluyen, entre otros, tensioactivos aniónicos, catiónicos, no iónicos, zwitteriónicos y anfóteros, incluidos los tensioactivos derivados de aminoácidos naturales. Los tensioactivos aniónicos incluyen, entre otros, lauril sulfato de sodio, sulfosuccinato de dioctilo sódico y sulfonato de sodio dioctilo, ácido quenodesoxicólico, sal de sodio N-lauroilsarcosina, dodecil sulfato de litio, sal de sodio de ácido sulfónico de 1 octano, hidrato de colato de sodio, desoxicolato de sodio y sal de sodio de ácido glicodesoxicólico. Los tensioactivos catiónicos incluyen, entre otros, cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio monohidrato y bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Los tensioactivos zwitteriónicos incluyen, entre otros, CHAPS, CHAPSO, SB3-10 y SB3-12. Los tensioactivos no iónicos incluyen, entre otros, digitonina, Triton X-100, Triton X-114, TWEEN-20 y TWEEN-80. Los tensioactivos también incluyen, entre otros, lauromacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 10, 40, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, polisorbato 60,

polisorbato 65 y polisorbato 80, lecitina de soja y otros fosfolípidos como dioleil fosfatidilcolina (DOPC), dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y (dioleil fosfatidilglicerol) DOPG; éster de ácidos grasos sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. Por lo tanto, se proporcionan, además, formulaciones que comprenden estos tensioactivos, ya sea individualmente o como una mezcla en diferentes proporciones. En una modalidad de la presente descripción, el tensioactivo es polisorbato 80 o polisorbato 20. En una modalidad de la presente descripción, el tensioactivo es polisorbato 80.

[0088] En ciertas modalidades, el tensioactivo es polisorbato 80 o polisorbato 20, y la cantidad de polisorbato 80 o polisorbato 20 está entre 0,1 mg y 1,0 mg. En ciertas modalidades, la cantidad de polisorbato 80 o polisorbato 20 es de 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,4 mg, 0,5 mg, 0,6 mg, 0,7 mg, 0,8 mg, 0,9 mg o 1,0 mg. En ciertas modalidades, la cantidad de polisorbato 80 o polisorbato 20 es de aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 0,2 mg, aproximadamente 0,3 mg, aproximadamente 0,4 mg, aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 0,6 mg, aproximadamente 0,7 mg, aproximadamente 0,8 mg, aproximadamente 0,9 mg o aproximadamente 1,0 mg. En ciertas modalidades, la cantidad de polisorbato 80 es de 0,22 mg. En ciertas modalidades, la cantidad de polisorbato 80 es de 0,29 mg. En ciertas modalidades, la cantidad de polisorbato 20 es de 0,22 mg. En ciertas modalidades, la cantidad de polisorbato 20 es de 0,29 mg.

[0089] En las formulaciones reconstituidas, el tensioactivo está en una concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 g/l. En varias modalidades de las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en este documento, la concentración de tensioactivo es 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 g/l. Del mismo modo, en ciertas modalidades de la descripción, el tensioactivo se incorpora en una concentración de aproximadamente 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 % en peso/volumen. En ciertas modalidades de la descripción, el tensioactivo se incorpora en una concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,05 % en peso/volumen. En ciertas modalidades, el tensioactivo se incorpora en una concentración de aproximadamente 0,02 % peso/volumen.

[0090] En algunas modalidades, el tensioactivo es polisorbato 20 o polisorbato 80. En algunas modalidades, el tensioactivo es polisorbato 80. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende 0,05-0,3 mg/ml de tensioactivo. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende al menos 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 % en peso/volumen de tensioactivo. En algunas modalidades, el tensioactivo está presente en la

formulación farmacéutica a una concentración de al menos 0,02 % peso/volumen. En ciertas modalidades, el polisorbato 80 o polisorbato 20 se incorpora en una concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,05 % peso/volumen. En ciertas modalidades, el polisorbato 80 o el polisorbato 20 se incorporan en una concentración de aproximadamente 0,02 % peso/volumen.

Formulaciones de ActRIIa

[0091] En algunas modalidades de las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento, los viales de la proteína de fusión de ActRIIa proporcionados en el presente documento comprenden una proteína de fusión de ActRIIa y uno o más aditivos farmacéuticos y/o excipientes. En algunas modalidades, las formulaciones farmacéuticas están liofilizadas. En algunas modalidades, las formulaciones se reconstituyen a partir de una formulación liofilizada. En una modalidad de las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en este documento, un vial de una formulación farmacéutica liofilizada comprende 55 mg de proteína de fusión de ActRIIa; 0,48 mg de ácido cítrico monohidratado, 2,56 mg de citrato trisódico deshidratado, 0,22 mg de polisorbato 80 y 88 mg de sacarosa. En otra modalidad, dicho vial se rehidrata con 1,0 ml de líquido, p. ej., agua para inyección estéril. En otra modalidad de las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en este documento, un vial comprende una proteína de fusión de ActRIIa de 72,5 mg; 0,64 mg de ácido cítrico monohidratado, 3,37 mg de citrato trisódico deshidratado, 0,29 mg de polisorbato 80 y 116 mg de sacarosa, en donde la formulación está liofilizada. En otra modalidad, dicho vial se rehidrata con 1,3 ml de líquido, p. ej., agua para inyección estéril. En otras modalidades, dichos viales comprenden uno, dos o los tres de citrato, p. ej., citrato 10 mM; sacarosa, p. ej., 8 % (peso/volumen) de sacarosa; y/o polisorbato 80, p. ej., a pH 5,0 a 7,0, p. ej., polisorbato 80 al 0,02 % (peso/volumen) a pH 5,8.

[0092] En algunas modalidades, una vez reconstituido con agua estéril, el vial comprende 50 mg/ml de la proteína de fusión de ActRIIa del SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 41, citrato 10 mM, 0,2 mg/ml de polisorbato 80 y 8 % en peso de sacarosa. En algunas modalidades, una vez reconstituido con agua estéril, el vial comprende 50 mg/ml de sotatercept, 10 mM de citrato, 0,2 mg/ml de polisorbato 80 y 8 % en peso de sacarosa.

[0093] En algunas modalidades, la formulación farmacéutica reconstituida comprende 50 mg/ml del SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 41, 10 mM de citrato, 0,2 mg/ml de polisorbato 80 y 80 mg/ml de sacarosa a pH 5,8. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica reconstituida comprende 50 mg/ml de sotatercept, 10 mM de citrato, 0,2 mg/ml de polisorbato 80 y 80 mg/ml de sacarosa a pH 5,8.

[0094] En ciertas modalidades, la dosis se administra por vía parenteral. En algunas modalidades, la dosis se administra mediante inyección subcutánea. En algunas modalidades, la dosis se administra mediante inyección intradérmica. En algunas modalidades, la dosis se administra mediante inyección intramuscular. En algunas modalidades, la dosis se administra mediante inyección intravenosa. En algunas modalidades, la dosis se autoadministra.

Kits

[0095] La presente descripción proporciona un kit que comprende una formulación farmacéutica liofilizada y un dispositivo de inyección. En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada comprende una proteína ActRIIa (p. ej., una proteína que es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica al SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 32), o fragmentos, variantes funcionales o formas modificadas de las mismas. En ciertas modalidades, la proteína se une a uno o más ligandos seleccionados del grupo que consiste en activina A, activina B y GDF11. En ciertas modalidades de este tipo, la proteína se une, además, a uno o más ligandos seleccionados del grupo que consiste en BMP10, GDF8 y BMP6. En ciertas modalidades, la proteína se une a la activina y/o GDF11.

[0096] En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada comprende una proteína que comprende, consiste esencialmente o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica al SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 32. En ciertas modalidades de este tipo, la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 95 % o 99 % idéntica al SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 32, en donde la proteína se une a la activina y/o GDF11. En ciertas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 32. En otras modalidades, la proteína consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 32. En ciertas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 41. En otras modalidades, la proteína consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 41.

[0097] En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada comprende una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32. En ciertas modalidades, la proteína consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32. En otras modalidades, la proteína consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32. En otras

modalidades, la proteína consiste en una variante del SEQ ID NO: 32 que carece del residuo de lisina C-terminal (es decir, SEQ ID NO: 41).

[0098] En ciertas modalidades de lo anterior, la formulación farmacéutica liofilizada comprende una proteína de fusión que comprende, además, un dominio Fc de una inmunoglobulina. En ciertas modalidades de este tipo, el dominio Fc de la inmunoglobulina es un dominio Fc de una inmunoglobulina IgG1. En otras modalidades, la proteína de fusión comprende, además, un dominio enlazador situado entre el dominio de la proteína y el dominio Fc de la inmunoglobulina. En ciertas modalidades, el dominio del enlazador es un enlazador de poliglicina.

[0099] En ciertas modalidades, la proteína es parte de un complejo proteico homodímero.

[0100] En ciertas modalidades, la proteína está glicosilada.

[0101] La presente descripción proporciona, además, un kit que comprende una formulación farmacéutica liofilizada estéril que comprende una proteína como se describe en este documento y un dispositivo de inyección. En algunas modalidades de los kits descritos en este documento, la formulación farmacéutica liofilizada estéril que comprende una proteína se llena previamente en uno o más recipientes, como uno o más viales **Figura 1**.

[0102] En ciertas modalidades, el rango de pH para la formulación farmacéutica liofilizada estéril que comprende una proteína de fusión de ActRIIa es de 5 a 7. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada estéril que comprende una proteína de fusión de ActRIIa comprende, además, un agente amortiguador. En algunas modalidades, el agente amortiguador se añade en una cantidad de al menos 10 mM. En algunas modalidades, el agente amortiguador se añade en una cantidad en el rango de entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 200 mM. En algunas modalidades, el agente amortiguador comprende citrato.

[0103] En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende, además, un tensioactivo. En algunas modalidades, el tensioactivo comprende un polisorbato. En algunas modalidades, el tensioactivo comprende polisorbato 20 o polisorbato 80. En algunas modalidades, el tensioactivo comprende polisorbato 80.

[0104] En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada comprende, además, un lioprotector. En algunas modalidades, el lioprotector comprende un azúcar, como un disacárido (p. ej., sacarosa). En algunas modalidades, el lioprotector comprende sacarosa, trehalosa, manitol, polivinilpirrolidona (PVP), dextrosa y/o glicina. En algunas modalidades, el lioprotector comprende sacarosa. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada comprende el lioprotector y la proteína en una relación de peso de al menos 1:1 proteína a lioprotector. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada comprende el lioprotector y la

proteína en una proporción de peso de 1:1 a 1:10 de proteína a lioprotector. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada comprende el lioprotector y la proteína en una relación de peso de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 o 1:10 de proteína a lioprotector. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica liofilizada comprende el lioprotector y la proteína en una relación de peso de 1:6 proteína a lioprotector. En ciertas modalidades de lo anterior, la formulación farmacéutica liofilizada comprende lioprotector en una cantidad suficiente para estabilizar la proteína.

[0105] En ciertas modalidades de los kits descritos en este documento, el dispositivo de inyección comprende una jeringa, como se muestra en la **Figura 1**. En ciertas modalidades de este tipo, la jeringa se llena previamente con una solución de reconstitución. En algunas modalidades, la solución de reconstitución comprende un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, el portador farmacéuticamente aceptable comprende una solución acuosa como agua, solución salina fisiológicamente tamponada u otro disolvente o vehículo como glicol, glicerol, un aceite o un éster orgánico inyectable. En algunas modalidades, el excipiente farmacéuticamente aceptable comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable seleccionado a partir de fosfato de calcio, carbonato de calcio, sulfato de calcio, una halita, un óxido metálico, un azúcar, un alcohol de azúcar, almidón, glicol, povidona, un hidrocarburo mineral, un polímero acrílico, un alcohol graso, estearato mineral, glicerina y/o un lípido. En ciertas modalidades, la solución de reconstitución comprende soluciones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, dispersiones, suspensiones o emulsiones. En ciertas modalidades de este tipo, la solución de reconstitución comprende un antioxidante, un amortiguador, un bacteriostático y/o un soluto que hace que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto. En otras modalidades, la solución de reconstitución comprende un agente de suspensión o espesante.

[0106] En ciertas modalidades de los kits descritos en este documento, el kit comprende, además, un adaptador de vial, como se muestra en **Figura 1**. En algunas modalidades, el vial (1) precargado con una formulación farmacéutica liofilizada de la invención se une a un extremo del adaptador del vial (3). En algunas modalidades, la jeringa precargada (2) con una solución de reconstitución como se describe en este documento se conecta a un extremo del adaptador del vial (3). En algunas modalidades, la jeringa precargada (2) con una solución de reconstitución como se describe en este documento y el vial (1) precargado con la formulación farmacéutica liofilizada se unen a los extremos opuestos del adaptador del vial (3). En algunas modalidades, la solución de reconstitución se transfiere de la jeringa precargada al vial. En algunas modalidades, la transferencia de la solución de reconstitución al vial precargado con la formulación

farmacéutica liofilizada reconstituye la formulación liofilizada en una solución inyectable estéril. En algunas modalidades, la formulación liofilizada se reconstituye en una solución inyectable estéril. En algunas modalidades, la formulación liofilizada se reconstituye en una solución inyectable estéril antes de su uso.

[0107] En otras modalidades de los kits descritos en este documento, el kit comprende, además, un aparato de bomba. En ciertas modalidades, el aparato de bomba comprende un conjunto de bombeo electromecánico. En ciertas modalidades, el aparato de bomba comprende un depósito para contener una solución inyectable estéril. En ciertas modalidades, el depósito contiene 1 ml de solución inyectable estéril. En ciertas modalidades, el aparato de bomba comprende uno o más viales o cartuchos que comprenden una solución inyectable estéril. En ciertas modalidades, los viales o cartuchos están precargados con solución inyectable estéril. En ciertas modalidades, los viales o cartuchos comprenden una solución inyectable estéril reconstituida a partir de una formulación liofilizada. En ciertas modalidades, el depósito se acopla al vial o cartucho. En ciertas modalidades, el vial o cartucho contiene 1-20 ml de solución inyectable estéril. En ciertas modalidades, el conjunto de bombeo electromecánico comprende una cámara de bomba. En ciertas modalidades, el conjunto de bombeo electromecánico está acoplado al depósito. En ciertas modalidades, la solución inyectable estéril se recibe del depósito en la cámara de la bomba. En algunas modalidades, el conjunto de bombeo electromecánico comprende un émbolo que se dispone de tal manera que la solución inyectable estéril en la cámara de la bomba está en contacto directo con el émbolo. En ciertas modalidades, se recibe una solución inyectable estéril del depósito a la cámara de la bomba durante una primera fase de bombeo, y se suministra desde la cámara de la bomba a un sujeto durante una segunda fase de bombeo. En ciertas modalidades, el conjunto de bombeo electromecánico comprende circuitos de control. En ciertas modalidades, los circuitos de control impulsan el émbolo para (a) introducir la solución inyectable estéril en la cámara de la bomba durante la primera fase de bombeo y (b) suministrar la solución inyectable estéril desde la cámara de la bomba en una pluralidad de movimientos discretos del émbolo durante la segunda fase de bombeo, entregando así la sustancia terapéutica al sujeto en una pluralidad de dosis controladas y discretas a lo largo de la segunda fase de bombeo. En ciertas modalidades, se repite un ciclo de alternancia de la primera y segunda fase de bombeo hasta que se administra una dosis deseada. En ciertas modalidades, el aparato de bomba está acoplado a un parche portátil. En ciertas modalidades, el aparato de bomba es un aparato de bomba portátil.

[0108] La presente descripción proporciona un kit utilizado para reconstituir una formulación farmacéutica liofilizada en una solución inyectable estéril. En ciertas modalidades, la solución inyectable estéril resultante es útil en los métodos descritos en este documento.

[0109] En ciertas modalidades de los kits descritos en este documento, el kit comprende, además, un dispositivo inyectable para su uso en la administración de la solución inyectable estéril por vía parenteral. En algunas modalidades, la solución inyectable estéril se administra mediante inyección subcutánea. En algunas modalidades, la solución inyectable estéril se administra mediante inyección intradérmica. En algunas modalidades, la solución inyectable estéril se administra mediante inyección intramuscular. En algunas modalidades, la solución inyectable estéril se administra mediante inyección intravenosa. En algunas modalidades, la solución inyectable estéril se autoadministra. En algunas modalidades, la solución inyectable estéril comprende una dosis terapéuticamente efectiva. En algunas modalidades, la dosis terapéuticamente efectiva comprende una dosis basada en el peso.

Polipéptidos de ActRIIa

[0110] En ciertas modalidades, la presente descripción se refiere a proteínas de fusión ActRIIa. Tal como se usa en este documento, el término "ActRIIa" se refiere a una familia de proteínas del receptor de activina tipo IIA (ActRIIa) de cualquier especie y variantes derivadas de dichas proteínas de fusión ActRIIa por mutagénesis u otra modificación. La referencia a ActRIIa en este documento se entiende como una referencia a cualquiera de las formas actualmente identificadas. Los miembros de la familia ActRIIa son generalmente proteínas transmembrana, compuestas por un dominio extracelular de unión a ligandos que comprende una región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad predicha de serina/treonina quinasa.

[0111] El término "proteína de fusión de ActRIIa" incluye proteínas que comprenden cualquier proteína natural de un miembro de la familia ActRIIa, así como cualquier variante de las mismas (incluidos mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil. A lo largo de la presente descripción, así como en las publicaciones de solicitud internacional de patente nro. WO 2006/012627 y WO 2007/062188, se proporcionan ejemplos de estas variantes de proteínas de fusión ActRIIa, que se incorporan aquí como referencia en su totalidad. La numeración de aminoácidos para todas las proteínas relacionadas con ActRIIa descritas en este documento se basa en la numeración de la secuencia de proteínas precursoras de ActRIIa humana que se proporciona a continuación (SEQ ID NO: 9), a menos que se indique específicamente lo contrario.

[0112] La secuencia canónica de la proteína precursora de ActRIIa humana es la siguiente:

1 **MGAAAKLAFA VFLISCSSGA ILGRSETQEC LFFNANWEKD RTNQTGVEPC**
51 **YGDKDKRRHC FATWKNISGS IEIVKQGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV**
101 **YFCCCEGNMC NEKFSYFPEM EVTQPTSNPV TPKPPYYNIL LYSLVPLMLI**

151 AGIVICAFWV YRHHKMAYPP VLVPTQDPGP PPPSPLLGLK PLQLLEVVKAR
201 GRFGCVWKAQ LLNEYVAVKI FPIQDKQSWQ NEYEVYSLPG MKHENILQFI
251 GAEKRGTSVD VDLWLITAFH EKGSLSDFLK ANVVSWNELC HIAETMARGL
301 AYLHEDIPGL KDGHKPAISH RDIKSKNVLL KNNLTACIAD FGLALKFEAG
351 KSAGDTHGQV GTRRYMAPEV LEGAINFQRD AFLRIDMYAM GLVLWELASR
401 CTAADGPVDE YMLPFEEEIG QHPSLEDME VVVHKKKRPV LRDYWQKHAG
451 MAMLCETIEE CWDHDAEARL SAGCVGERIT QMQRLTNIIT TEDIVTVVTM
501 VTNVDFPPKE SSL (SEQ ID NO: 9)

[0113] El péptido señal se indica con un solo subrayado; el dominio extracelular se indica en **negrita** ; y los posibles sitios de glicosilación endógenos ligados a N se indican con un subrayado doble.

[0114] La secuencia de la proteína ActRIIa humana extracelular procesada (madura) es la siguiente:

[0115] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIV
KQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVT
KPP (SEQ ID NO: 10)

[0116] La "cola" C-terminal del dominio extracelular se indica con un solo subrayado. La secuencia con la "cola" eliminada (una secuencia $\Delta 15$) es la siguiente:

[0117] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIV
KQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM (SEQ ID NO: 11)

[0118] La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína precursora humana ActRIIa se muestra a continuación (SEQ ID NO: 12), de la siguiente manera los nucleótidos 159-1700 de la secuencia de referencia de Genbank NM_001616.4. La secuencia de señales está subrayada.

1 ATGGGAGCTG CTGCAAAGTT GCGGTTTGCC GTCTTTCTTA TCTCCTGTTC
51 TTCAGGTGCT ATACTTGGTA GATCAGAAAC TCAGGAGTGT CTTTTCTTTA
101 ATGCTAATTG GGAAAAAGAC AGAACCAATC AAAGTGGTGT TGAACCGTGT
151 TATGGTGACA AAGATAAACG GCGGCATTGT TTTGCTACCT GGAAGAATAT
201 TTCTGGTTCC ATTGAAATAG TGAAACAAGG TTGTTGGCTG GATGATATCA
251 ACTGCTATGA CAGGACTGAT TGTGTAGAAA AAAAAGACAG CCCTGAAGTA
301 TATTTTTGTT GCTGTGAGGG CAATATGTGT AATGAAAAGT TTTCTTATTT
351 TCCGGAGATG GAAGTCACAC AGCCCACTTC AAATCCAGTT ACACCTAAGC
401 CACCCTATTA CAACATCCTG CTCTATTCCT TGGTGCCACT TATGTTAATT
451 GCGGGGATTG TCATTTGTGC ATTTTGGGTG TACAGGCATC ACAAGATGGC
501 CTACCCTCCT GTACTTGTTT CAACTCAAGA CCCAGGACCA CCCCCACCTT

551 CTCCATTACT AGGTTTGAAA CCACTGCAGT TATTAGAAGT GAAAGCAAGG
 601 GGAAGATTTG GTTGTGTCTG GAAAGCCCAG TTGCTTAACG AATATGTGGC
 651 TGTCAAATA TTTCCAATAC AGGACAAACA GTCATGGCAA AATGAATACG
 701 AAGTCTACAG TTTGCCTGGA ATGAAGCATG AGAACATATT ACAGTTCATT
 751 GGTGCAGAAA AACGAGGCAC CAGTGTTGAT GTGGATCTTT GGCTGATCAC
 801 AGCATTTTCAT GAAAAGGGTT CACTATCAGA CTTTCTTAAG GCTAATGTGG
 851 TCTCTTGGA TGAAGTGTGT CATATTGCAG AAACCATGGC TAGAGGATTG
 901 GCATATTTAC ATGAGGATAT ACCTGGCCTA AAAGATGGCC ACAAACCTGC
 951 CATATCTCAC AGGGACATCA AAAGTAAAAA TGTGCTGTTG AAAAACAACC
 1001 TGACAGCTTG CATTGCTGAC TTTGGGTTGG CCTTAAAATT TGAGGCTGGC
 1051 AAGTCTGCAG GCGATACCCA TGGACAGGTT GGTACCCGGA GGTACATGGC
 1101 TCCAGAGGTA TTAGAGGGTG CTATAAACTT CCAAAGGGAT GCATTTTTGA
 1151 GGATAGATAT GTATGCCATG GGATTAGTCC TATGGGAACT GGCTTCTCGC
 1201 TGTACTGCTG CAGATGGACC TGTAGATGAA TACATGTTGC CATTTGAGGA
 1251 GGAAATTGGC CAGCATCCAT CTCTTGAAGA CATGCAGGAA GTTGTTGTGC
 1301 ATAAAAA GAGGCCTGTT TTAAGAGATT ATTGGCAGAA ACATGCTGGA
 1351 ATGGCAATGC TCTGTGAAAC CATTGAAGAA TGTTGGGATC ACGACGCAGA
 1401 AGCCAGGTTA TCAGCTGGAT GTGTAGGTGA AAGAATTACC CAGATGCAGA
 1451 GACTAACAAA TATTATTACC ACAGAGGACA TTGTAACAGT GGTCACAATG
 1501 GTGACAAATG TTGACTTTCC TCCCAAAGAA TCTAGTCTA (SEQ ID NO: 12)

[0119] La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína ActRIIa humana soluble (extracelular) procesada es la siguiente:

ATACTTGGA GATCAGAAAC TCAGGAGTGT CTTTTCTTTA ATGCTAATTG

51 GGAAAAAGAC AGAACCAATC AAAGTGGTGT TGAACCGTGT TATGGTGACA
 101 AAGATAAACG GCGGCATTGT TTTGCTACCT GGAAGAATAT TTCTGGTTCC
 151 ATTGAAATAG TGAAACAAGG TTGTTGGCTG GATGATATCA ACTGCTATGA
 201 CAGGACTGAT TGTGTAGAAA AAAAAGACAG CCCTGAAGTA TATTTTTGTT
 251 GCTGTGAGGG CAATATGTGT AATGAAAAGT TTTCTTATTT TCCGGAGATG
 301 GAAGTCACAC AGCCCACTTC AAATCCAGTT ACACCTAAGC CACCC(SAQ ID
 NO:13)

[0120] ActRIIa está bien conservada entre los vertebrados, con grandes tramos del dominio extracelular completamente conservados. Por ejemplo, la **Figura 2** muestra una alineación de múltiples secuencias de un dominio extracelular de ActRIIa humana en comparación con varios ortólogos de ActRIIa. Muchos de los ligandos que se unen a ActRIIa también están altamente

conservados. En consecuencia, a partir de estas alineaciones, es posible predecir posiciones clave de aminoácidos dentro del dominio de unión al ligando que son importantes para las actividades normales de unión al ligando ActRIIa, así como predecir posiciones de aminoácidos que probablemente sean tolerantes a la sustitución sin alterar significativamente las actividades normales de unión al ligando ActRIIa. Por lo tanto, una proteína activa de la variante humana de ActRIIa útil de acuerdo con los métodos actualmente divulgados puede incluir uno o más aminoácidos en las posiciones correspondientes de la secuencia de otro ActRIIa de vertebrados, o puede incluir un residuo similar al de las secuencias humanas u otras secuencias de vertebrados.

[0121] Sin ánimo de limitar, los siguientes ejemplos ilustran este enfoque para definir una variante activa de ActRIIa. Como se ilustra en la **Figura 2**, F13 en el dominio extracelular humano es Y en ActRIIa de *Ovis aries* (SEQ ID NO: 62), *Gallus gallus* (SEQ ID NO: 65), *Bos Taurus* (SEQ ID NO: 66), *Tyto alba* (SEQ ID NO: 67) y *Myotis davidii* (SEQ ID NO: 68), lo que indica que los residuos aromáticos son tolerados en esta posición, incluidos F, W, e Y. Q24 en el dominio extracelular humano es R en ActRIIa de *Bos Taurus*, lo que indica que los residuos cargados serán tolerados en esta posición, incluidos D, R, K, H y E. S95 en el dominio extracelular humano es F en ActRIIa de *Gallus gallus* y *Tyto alba*, lo que indica que este sitio puede ser tolerante a una amplia variedad de cambios, incluyendo residuos polares, como E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y, y probablemente residuos hidrófobos como L, I o F. E52 en el dominio extracelular humano es D en ActRIIa de *Ovis aries*, lo que indica que los residuos ácidos son tolerados en esta posición, incluidos D y E. P29 en el dominio extracelular humano está relativamente mal conservado, apareciendo como S en ActRIIa de *Ovis aries* y L en ActRIIa de *Myotis davidii*, por lo que esencialmente cualquier aminoácido debe ser tolerado en esta posición.

[0122] Además, como se discutió anteriormente, las proteínas ActRIIa se han caracterizado en la técnica en términos de características estructurales/funcionales, particularmente con respecto a la unión de ligandos (Attisano et al. (1992) Cell 68 (1): 97-108; Greenwald et al. (1999) Nature Structural Biology 6 (1): 18-22; Allendorph et al. (2006) PNAS 103 (20): 7643-7648; Thompson et al. (2003) The EMBO Journal 22 (7): 1555-1566; así como las patentes de EE. UU. de Nos.: 7,709,605, 7,612,041 y 7,842,663). Además, de las enseñanzas de este documento, estas referencias proporcionan una amplia orientación sobre cómo generar variantes de ActRIIa que retengan una o más actividades deseadas (p. ej., actividad de unión a ligandos).

[0123] P. ej., un motivo estructural definitorio conocido como pliegue de toxina de tres dedos es importante para la unión de ligandos por receptores de tipo I y tipo II y está formado por residuos de cisteína conservados ubicados en diferentes posiciones dentro del dominio extracelular de cada receptor monomérico (Greenwald et al. (1999) Nat Struct Biol 6: 18-22; y

Hinck (2012) FEBS Lett 586: 1860-1870). En consecuencia, los dominios centrales de unión al ligando de ActRIIa humana, demarcados por la más externa de estas cisteínas conservadas, corresponden a las posiciones 30-110 del SEQ ID NO: 9 (precursor de ActRIIa). Por lo tanto, los aminoácidos estructuralmente menos ordenados que flanquean estas secuencias centrales demarcadas por cisteína pueden truncarse en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 residuos en el extremo N y en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 residuos en el extremo C sin alterar necesariamente la unión del ligando. Los truncamientos ejemplares de los dominios extracelulares de ActRIIa incluyen los SEQ ID NOs: 10 y 11.

[0124] En consecuencia, una fórmula general para una porción activa (p. ej., la unión al ligando) de ActRIIa es una proteína que comprende, consiste esencialmente o consiste en los aminoácidos 30-110 del SEQ ID NO: 9. Por lo tanto, las proteínas ActRIIa pueden, p. ej., comprender, consistir esencialmente o consistir en una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una porción de ActRIIa que comienza en un residuo correspondiente a cualquiera de los aminoácidos 21-30 (p. ej., comenzando en cualquiera de los aminoácidos 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30) del SEQ ID NO: 9 y terminando en una posición correspondiente a cualquiera de los aminoácidos 110-135 (p. ej., terminando en cualquiera de los aminoácidos 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 o 135) del SEQ ID NO: 9. Otros ejemplos incluyen constructos que comienzan en una posición seleccionada entre 21-30 (p. ej., comenzando en cualquiera de los aminoácidos 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30), 22-30 (p. ej., comenzando en cualquiera de los aminoácidos 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30), 23-30 (p. ej., comenzando en cualquiera de los aminoácidos 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30), 24-30 (p. ej., comenzando en cualquiera de los aminoácidos 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30) del SEQ ID NO: 9, y terminando en una posición seleccionada entre 111-135 (p. ej., terminando en cualquiera de los aminoácidos 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 o 135), 112-135 (p. ej., terminados en cualquiera de los aminoácidos 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 o 135), 113-135 (p. ej., terminando en cualquiera de los aminoácidos 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 o 135), 120-135 (p. ej., terminando en cualquiera de los aminoácidos 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 o 135), 130-135 (p. ej., terminando en cualquiera de los aminoácidos 130, 131, 132, 133, 134 o 135), 111-134 (p. ej., que

terminan en cualquiera de los aminoácidos 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 o 134), 111-133 (p. ej., que terminan en cualquiera de los aminoácidos 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 118, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132 o 133), 111-132 (p. ej., terminando en cualquiera de los aminoácidos 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131 o 132), o 111-131 (p. ej., terminando en cualquiera de los aminoácidos 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130 o 131) de la SEQ ID NO: 9. También se contemplan variantes dentro de estos rangos, en particular aquellas que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad a la porción correspondiente del SEQ ID NO: 9. Por lo tanto, en algunas modalidades, una proteína ActRIIa puede comprender, consiste esencialmente en, o consistir en una proteína que es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticos a los aminoácidos 30-110 del SEQ ID NO: 9. Opcionalmente, las proteínas ActRIIa comprenden una proteína que es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticos a los aminoácidos 30-110 del SEQ ID NO: 9, y que comprende no más de 1, 2, 5, 10 o 15 cambios conservadores de aminoácidos en el bolsillo de unión al ligando.

[0125] En ciertas modalidades, la descripción se relaciona con antagonistas de GDF/BMP (inhibidores) que comprenden una proteína ActRIIa, que incluye fragmentos, variantes funcionales y formas modificadas de la misma, así como usos de la misma (p. ej., aumentar una respuesta inmune en un paciente que la necesita y tratar el cáncer). Preferiblemente, las proteínas ActRIIa son solubles (p. ej., un dominio extracelular de ActRIIa). En algunas modalidades, las proteínas ActRIIa inhiben (p. ej., señalización Smad) de uno o más ligandos GDF/BMP (p. ej., GDF11, GDF8, activina (activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E) BMP6, GDF3, BMP15 y/o BMP10). En algunas modalidades, las proteínas ActRIIa se unen a uno o más ligandos GDF/BMP (p. ej., GDF11, GDF8, activina (activina A, activina B, activina AB, activina C, activina E) BMP6, GDF3, BMP15 y/o BMP10). En algunas modalidades, la proteína ActRIIa de la descripción comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a una porción de ActRIIa comenzando en un residuo correspondiente a los aminoácidos 21-30 (p. ej., comenzando en

cualquiera de los aminoácidos 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30) del SEQ ID NO: 9 y terminando en una posición correspondiente a cualquiera de los aminoácidos 110-135 (p. ej., terminando en cualquiera de los aminoácidos 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 o 135) del SEQ ID NO: 9. En algunas modalidades, las proteínas ActRIIa comprenden, constan o consisten esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a los aminoácidos 30-110 del SEQ ID NO: 9. En ciertas modalidades, las proteínas ActRIIa comprenden, constan o consisten esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a los aminoácidos 21-135 del SEQ ID NO: 9.

[0126] En ciertas modalidades, el dominio extracelular (ECD) de las proteínas del receptor de activina humano tipo IIA (ActRIIa) o derivados de las mismas están unidos a un dominio constante de una inmunoglobulina, como el dominio Fc de IgG1 humana. En algunas modalidades, la proteína ActRIIa es una proteína de fusión que comprende un dominio ActRIIa y uno o más dominios proteicos heterólogos a ActRIIa. En algunas modalidades, la proteína ActRIIa es una proteína de fusión que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina. En algunas modalidades, el dominio Fc de la inmunoglobulina es un dominio Fc de una inmunoglobulina IgG1. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa comprende, además, un dominio enlazador situado entre el dominio de la proteína ActRIIa y uno o más dominios heterólogos (p. ej., un dominio de inmunoglobulina Fc). En algunas modalidades, el dominio del enlazador se selecciona del grupo que consta de: TGGG (SEQ ID NO: 23), TGGGG (SEQ ID NO: 21), SGGGG (SEQ ID NO: 22), GGGGS (SEQ ID NO: 25), GGG (SEQ ID NO: 19), GGGG (SEQ ID NO: 20) y SGGG (SEQ ID NO: 24). En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 41. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32 o 41.

[0127] En algunas modalidades, las proteínas de fusión ActRIIa comprenden, constan o consisten esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85

%, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los SEQ ID NOs: 9, 10, 11, 32, 36 y 39.

[0128] En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa es parte de un complejo de proteínas homodímeras. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa está glicosilada. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa tiene un patrón de glicosilación que se puede obtener mediante expresión en una célula de ovario de hámster chino.

[0129] En algunas modalidades alternativas, la proteína de fusión de ActRIIa (p. ej., SEQ ID NO: 32) puede carecer de la lisina C-terminal. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ActRIIa que carece de la lisina C-terminal es SEQ ID NO: 41. Por ejemplo, en ciertas modalidades de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento, la proteína de fusión de ActRIIa puede estar compuesta por 1-100 % del SEQ ID NO: 32. Por ejemplo, en ciertas modalidades de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento, la proteína de fusión de ActRIIa está compuesta por 1-100 % del SEQ ID NO: 41.

[0130] En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento contienen una mezcla del SEQ ID NO: 32 y una variante del SEQ ID NO: 32 que carece del residuo de lisina C-terminal (SEQ ID NO: 41). En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento contienen una mezcla del SEQ ID NO: 32 y una variante del SEQ ID NO: 32 que carece del residuo de lisina C-terminal (SEQ ID NO: 41) en donde la mezcla contiene 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 %, 80 %, 79 %, 78 %, 77 %, 76 %, 75 %, 74 %, 73 %, 72 %, 71 %, 70 %, 69 %, 68 %, 67 %, 66 %, 65 %, 64 %, 63 %, 62 %, 61 %, 60 %, 59 %, 58 %, 57 %, 56 %, 55 %, 54 %, 53 %, 52 %, 51 %, 50 %, 49 %, 48 %, 47 %, 46 %, 45 %, 44 %, 43 %, 42 %, 41 %, 40 %, 39 %, 38 %, 37 %, 36 %, 35 %, 34 %, 33 %, 32 %, 31 %, 30 %, 29 %, 28 %, 27 %, 26 %, 25 %, 24 %, 23 %, 22 %, 21 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % en peso del SEQ ID NO:32.

[0131] En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento contienen una mezcla del SEQ ID NO: 32 y una variante del SEQ ID NO: 32 que

carece del residuo de lisina C-terminal (SEQ ID NO: 41) en donde la mezcla contiene aproximadamente 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 %, 80 %, 79 %, 78 %, 77 %, 76 %, 75 %, 74 %, 73 %, 72 %, 71 %, 70 %, 69 %, 68 %, 67 %, 66 %, 65 %, 64 %, 63 %, 62 %, 61 %, 60 %, 59 %, 58 %, 57 %, 56 %, 55 %, 54 %, 53 %, 52 %, 51 %, 50 %, 49 %, 48 %, 47 %, 46 %, 45 %, 44 %, 43 %, 42 %, 41 %, 40 %, 39 %, 38 %, 37 %, 36 %, 35 %, 34 %, 33 %, 32 %, 31 %, 30 %, 29 %, 28 %, 27 %, 26 %, 25 %, 24 %, 23 %, 22 %, 21 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % en peso del SEQ ID NO:32.

[0132] En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento contienen una mezcla del SEQ ID NO: 32 y una variante del SEQ ID NO: 32 que carece del residuo de lisina C-terminal (SEQ ID NO: 41) en donde la mezcla contiene 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 %, 80 %, 79 %, 78 %, 77 %, 76 %, 75 %, 74 %, 73 %, 72 %, 71 %, 70 %, 69 %, 68 %, 67 %, 66 %, 65 %, 64 %, 63 %, 62 %, 61 %, 60 %, 59 %, 58 %, 57 %, 56 %, 55 %, 54 %, 53 %, 52 %, 51 %, 50 %, 49 %, 48 %, 47 %, 46 %, 45 %, 44 %, 43 %, 42 %, 41 %, 40 %, 39 %, 38 %, 37 %, 36 %, 35 %, 34 %, 33 %, 32 %, 31 %, 30 %, 29 %, 28 %, 27 %, 26 %, 25 %, 24 %, 23 %, 22 %, 21 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % en peso del SEQ ID NO:41.

[0133] En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica descrita en este documento contiene una mezcla del SEQ ID NO: 32 y una variante del SEQ ID NO: 32 que carece del residuo de lisina C-terminal (SEQ ID NO: 41) en donde la mezcla contiene aproximadamente 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 %, 80 %, 79 %, 78 %, 77 %, 76 %, 75 %, 74 %, 73 %, 72 %, 71 %, 70 %, 69 %, 68 %, 67 %, 66 %, 65 %, 64 %, 63 %, 62 %, 61 %, 60 %, 59 %, 58 %, 57 %, 56 %, 55 %, 54 %, 53 %, 52 %, 51 %, 50 %, 49 %, 48 %, 47 %, 46 %, 45 %, 44 %, 43 %, 42 %, 41 %, 40 %, 39 %, 38 %, 37 %, 36 %, 35 %, 34 %, 33 %, 32 %, 31 %, 30 %, 29 %, 28 %, 27 %, 26 %, 25 %, 24 %, 23 %, 22 %, 21 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % en peso del SEQ ID NO:41.

[0134] En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento contienen el 100 % del SEQ ID NO: 32 en peso. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento contienen el 100 % del SEQ ID NO: 41 en peso.

[0135] En ciertos aspectos, la presente descripción se refiere a las proteínas trampa GDF (también denominadas "trampas GDF"). En algunas modalidades, las trampas GDF de la presente descripción son variantes de proteínas ActRIIa (p. ej., ActRIIa) que comprenden una o

más mutaciones (p. ej., adiciones de aminoácidos, deleciones, sustituciones y combinaciones de los mismos) en el dominio extracelular (también denominado dominio de unión al ligando) de una proteína ActRIIa (p. ej., una proteína ActRIIa de "tipo silvestre" o no modificada) de modo que la variante de proteína ActRIIa tiene una o más actividades de unión al ligando alteradas que la proteína ActRIIa de tipo silvestre correspondiente. En ciertas modalidades, las proteínas trampa GDF de la presente descripción conservan al menos una actividad similar a la correspondiente proteína ActRIIa de tipo silvestre. Por ejemplo, las trampas de GDF preferibles se unen e inhiben (p. ej., antagonizan) la función de GDF11 y/o GDF8. En algunas modalidades, las trampas GDF de la presente descripción se unen e inhiben aún más a uno o más de los ligandos de GDF/BMP. En consecuencia, la presente descripción proporciona proteínas trampa GDF que tienen una especificidad de unión alterada para uno o más ligandos de ActRIIa.

[0136] A modo ilustrativo, se pueden seleccionar una o más mutaciones que aumenten la selectividad del dominio de unión al ligando alterado para GDF11 y/o GDF8 sobre uno o más ligandos de unión a ActRIIa, como las activinas, particularmente la activina A. Opcionalmente, el dominio de unión al ligando alterado tiene una proporción de K_d para la unión de activina a K_d para la unión de GDF11 y/o GDF8 que sea al menos 2, 5, 10, 20, 50, 100 o incluso 1000 veces mayor en relación con la proporción para el dominio de unión al ligando de tipo silvestre. Opcionalmente, el dominio de unión al ligando alterado tiene una proporción de IC50 para inhibir la activina a IC50 para inhibir GDF11 y/o GDF8 que es al menos 2, 5, 10, 20, 50, 100 o incluso 1000 veces mayor en relación con el dominio de unión al ligando de tipo silvestre. Opcionalmente, el dominio de unión al ligando alterado inhibe GDF11 y/o GDF8 con un IC50 al menos 2, 5, 10, 20, 50, 100 o incluso 1000 veces menor que el IC50 para inhibir la activina.

Métodos de uso

[0137] En ciertos aspectos, la descripción proporciona un método para tratar la hipertensión arterial pulmonar (HAP), que comprende la administración de una formulación farmacéutica descrita en este documento a un paciente que la necesita.

[0138] En ciertos aspectos, la descripción proporciona un método para tratar la hipertensión arterial pulmonar (HAP) en un paciente que la necesita, que comprende la reconstitución de una formulación farmacéutica liofilizada descrita en este documento para crear una formulación reconstituida y la administración de la formulación reconstituida al paciente.

[0139] En ciertos aspectos, la descripción proporciona una formulación farmacéutica para el tratamiento de la HAP en un sujeto que lo necesita, que comprende la reconstitución de una formulación farmacéutica liofilizada que comprende una proteína de fusión de ActRIIa humana unida a un dominio constante de una inmunoglobulina y la administración de la formulación

reconstituida al sujeto, en donde el régimen de dosificación comprende: 1) la administración de una dosis inicial de 0,3 mg/kg; 2) monitorear la respuesta de un sujeto; y 3) administrar una dosis posterior de 0,7 mg/kg; y en donde al sujeto se le administra la dosis subsiguiente cada tres semanas. En algunas modalidades, la dosis posterior se modifica en función de la respuesta del sujeto.

[0140] En ciertos aspectos, la descripción proporciona un método para tratar la hipertensión arterial pulmonar (HAP), que comprende la administración de una formulación farmacéutica descrita en este documento a un paciente que la necesita, en donde la administración de la formulación farmacéutica da como resultado un cambio en uno o más de los siguientes parámetros hemodinámicos o funcionales: una reducción de la resistencia vascular pulmonar (RVP); un aumento en la distancia de caminata de 6 minutos (6MWD); una disminución de los niveles de péptido natriurético tipo B (NT-proBNP) N-terminal; la prevención o reducción de la progresión de la clase funcional de la hipertensión pulmonar según lo reconocido por la Organización Mundial de la Salud (OMS); la promoción o el aumento de la regresión de la clase funcional de la hipertensión pulmonar reconocida por la OMS; una mejora en la función ventricular derecha; una mejora en la presión de la arteria pulmonar; y/o una mejoría en la presión media de la aurícula derecha.

[0141] En ciertos aspectos, la descripción proporciona un método para tratar la hipertensión arterial pulmonar (HAP), que comprende la administración de una formulación farmacéutica descrita en este documento a un paciente que la necesita, en donde la administración de la formulación farmacéutica da como resultado una mayor capacidad de ejercicio, proporciona una mejoría clínica, mejora la clase funcional (CF) de la OMS y retrasa la progresión de la enfermedad, incluso para reducir el riesgo de muerte y hospitalización por HAP.

[0142] En ciertos aspectos, la descripción proporciona un método para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y/o la gravedad de una o más complicaciones de la hipertensión arterial pulmonar, que comprende la administración a un paciente que lo necesite de una formulación farmacéutica descrita en este documento, en donde la administración de dicha formulación da como resultado un cambio en uno o más de los siguientes parámetros hemodinámicos o funcionales: una reducción de la resistencia vascular pulmonar (RVP); un aumento en la distancia de caminata de 6 minutos (6MWD); una disminución de los niveles de péptido natriurético tipo B (NT-proBNP) N-terminal; la prevención o reducción de la progresión de la clase funcional de la hipertensión pulmonar reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS); la promoción o aumento de la regresión de la clase funcional de la hipertensión pulmonar reconocida por la OMS; una mejora en la función ventricular derecha; una mejora en la

presión de la arteria pulmonar; y/o una mejoría en la presión media de la aurícula derecha. En algunas modalidades, una o más complicaciones de la hipertensión arterial pulmonar se seleccionan del grupo que consiste en: proliferación de células endoteliales y/o músculo liso en la arteria pulmonar, angiogénesis en la arteria pulmonar, disnea, dolor torácico, remodelación vascular pulmonar, hipertrofia ventricular derecha y fibrosis pulmonar.

[0143] En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento reduce la RVP en el paciente. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento reduce la RVP en el paciente en al menos un 10 % (p. ej., 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, o al menos 50 %). En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento reduce la RVP del paciente en al menos un 20 %. En algunas modalidades, la reducción de la RVP es el resultado de la disminución de la presión media de la arteria pulmonar. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento aumenta la distancia de caminata de 6 minutos del paciente. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento aumenta la distancia de caminata de 6 minutos del paciente en al menos 10 metros (p. ej., al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300 o más de 400 metros). En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento aumenta la distancia de caminata de 6 minutos del paciente en al menos 30 metros. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento disminuye los niveles de NT-proBNP en el paciente. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento disminuye los niveles de NT-proBNP en el paciente en al menos un 10 % (p. ej., 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 % o al menos 80 %). En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento disminuye los niveles de NT-proBNP en el paciente en al menos un 30 %. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento disminuye los niveles de NT-proBNP a niveles normales. En algunas modalidades, el nivel normal de NT-proBNP es <100 pg/ml.

[0144] En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento previene o reduce la progresión de la clase funcional de la hipertensión pulmonar según lo reconocido por la OMS. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento previene o reduce la progresión de la Clase Funcional de la hipertensión pulmonar de la Clase Funcional I a la Clase II reconocida por

la OMS. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento previene o reduce la progresión de la Clase Funcional de la hipertensión pulmonar de la Clase Funcional II a la Clase III reconocida por la OMS. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento previene o reduce la progresión de la Clase Funcional de la hipertensión pulmonar de la Clase Funcional III a la Clase IV como lo reconoce la OMS. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento promueve o aumenta la regresión de la clase funcional de la hipertensión pulmonar según lo reconocido por la OMS. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento promueve o aumenta la regresión de la clase funcional de la hipertensión pulmonar de la hipertensión pulmonar de clase IV a clase III según lo reconocido por la OMS. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento promueve o aumenta la regresión de la clase funcional de la hipertensión pulmonar de la hipertensión pulmonar de clase III a clase II según lo reconocido por la OMS. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento promueve o aumenta la regresión de la clase funcional de la hipertensión pulmonar de la hipertensión pulmonar de clase II a clase I según lo reconocido por la OMS.

[0145] En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento mejora la función ventricular derecha en el paciente. En algunas modalidades, la mejora en la función ventricular derecha se debe a un aumento en el cambio del área fraccional del ventrículo derecho. En algunas modalidades, la mejora de la función ventricular derecha se debe a una disminución de la hipertrofia ventricular derecha. En algunas modalidades, la mejora de la función ventricular derecha se debe a un aumento de la fracción de eyección. En algunas modalidades, la mejora en la función ventricular derecha se debe a un aumento en el cambio de área fraccional del ventrículo derecho y la fracción de eyección.

[0146] En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento mejora la presión de la arteria pulmonar en el paciente. En algunas modalidades, la mejora en la presión de la arteria pulmonar es una reducción en la presión media de la arteria pulmonar (mPAP). En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento reduce la mPAP en el paciente en al menos un 10 % (p. ej., 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, o al menos 50 %). En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento reduce la mPAP en al menos 3 mmHg (p. ej., al menos 3, 5, 7, 10, 12, 15, 20 o 25 mmHg) en el paciente. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones

farmacéuticas descritas en este documento mejora la presión auricular derecha media (mRAP) en el paciente. En algunas modalidades, la mejora en la mRAP es una reducción en la mRAP. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento reduce la mRAP en el paciente en al menos un 10 % (p. ej., 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o al menos 50 %). En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento reduce la mRAP en al menos 1 mmHg (p. ej., al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 mmHg) en el paciente.

[0147] En algunas modalidades, el paciente tiene una resistencia vascular pulmonar (RVP) mayor o igual a 3 unidades de Wood. En algunas modalidades, el paciente tiene una distancia de caminata de 6 minutos de 150 a 550 metros. En algunas modalidades, el paciente tiene niveles elevados de NT-proBNP en comparación con un paciente sano. En algunas modalidades, el paciente tiene un nivel de NT-proBNP de al menos 100 pg/ml (p. ej., 100, 150, 200, 300, 400, 500, 1000, 3000, 5000, 10.000, 15.000 o 20.000 pg/ml). En algunas modalidades, el paciente tiene niveles elevados de péptido natriurético cerebral (BNP) en comparación con un paciente sano. En algunas modalidades, el paciente tiene un nivel de BNP de al menos 100 pg/ml (p. ej., 100, 150, 200, 300, 400, 500, 1000, 3000, 5000, 10.000, 15.000 o 20.000 pg/ml). En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento disminuye los niveles de BNP en el paciente en al menos un 10 % (p. ej., 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, o al menos 80 %). En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento disminuye los niveles de BNP a niveles normales (es decir, <100 pg/ml). En algunas modalidades, el paciente tiene una presión arterial pulmonar media (mPAP) seleccionada del grupo que consiste en: una mPAP de al menos 20 mmHg; una mPAP de al menos 25 mmHg; una mPAP de al menos 30 mmHg; una mPAP de al menos 35 mmHg; una mPAP de al menos 40 mmHg; una mPAP de al menos 45 mmHg; y una mPAP de al menos 50 mmHg. En algunas modalidades, el paciente tiene una presión auricular derecha media (mRAP) seleccionada del grupo que consiste en: una mRAP de al menos 5 mmHg; un mRAP de al menos 6 mmHg; un mRAP de al menos 8 mmHg; un mRAP de al menos 10 mmHg; un mRAP de al menos 12 mmHg; un mRAP de al menos 14 mmHg; y un mRAP de al menos 16 mmHg.

[0148] En algunas modalidades, la HAP es hipertensión arterial pulmonar (HAP) idiopática. En algunas modalidades, la HAP es HAP hereditaria. En algunas modalidades, la HAP es HAP inducida por fármacos o toxinas. En algunas modalidades, la HAP es HAP asociada con derivaciones sistémicas a pulmonares simples y congénitas al menos 1 año después de la reparación de la derivación. En algunas modalidades, el paciente tiene hipertensión pulmonar de

Clase Funcional II o Clase III de acuerdo con el sistema de clasificación funcional de la Organización Mundial de la Salud para la hipertensión pulmonar. En algunas modalidades, el paciente tiene hipertensión pulmonar funcional de Clase I, Clase II, Clase III o Clase IV según lo reconocido por la Organización Mundial de la Salud. En algunas modalidades, el paciente tiene hipertensión pulmonar de Clase Funcional I, Clase II, Clase III o Clase IV de acuerdo con el sistema de clasificación funcional de la Organización Mundial de la Salud para la hipertensión pulmonar. En algunas modalidades, el paciente tiene hipertensión pulmonar de clase IV funcional de acuerdo con el sistema de clasificación funcional de la Organización Mundial de la Salud para hipertensión pulmonar. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento aumenta la supervivencia libre de trasplante en el paciente. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento aumenta la supervivencia libre de trasplante en el paciente en al menos un 10 % (p. ej., 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o al menos 50 %). En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento disminuye la hipertrofia ventricular derecha en el paciente. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento disminuye la hipertrofia ventricular derecha en el paciente en al menos un 10 % (p. ej., 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o al menos 50 %). En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento disminuye la hipertrofia del músculo liso en el paciente. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento disminuye la hipertrofia del músculo liso en el paciente en al menos un 10 % (p. ej., 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o al menos 50 %). En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento disminuye la musculatura de la arteriola pulmonar en el paciente. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento disminuye la musculatura de la arteriola pulmonar en el paciente en al menos un 10 % (p. ej., 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o al menos 50 %).

[0149] En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento mejora la capacidad de ejercicio del paciente. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento disminuye el índice de disnea de Borg (BDI) del paciente. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento reduce el BDI del paciente en al menos 0,5 puntos de índice (p. ej., al menos 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10 puntos de índice). En algunas modalidades, el paciente tiene una función renal

disminuida. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento mejora aún más la función renal. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento retrasa el empeoramiento clínico de la hipertensión arterial pulmonar. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento retrasa el empeoramiento clínico de la hipertensión arterial pulmonar de acuerdo con el sistema de clasificación funcional de la Organización Mundial de la Salud para la hipertensión pulmonar. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento reduce el riesgo de hospitalización por una o más complicaciones asociadas con la hipertensión arterial pulmonar. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento reduce el riesgo de morbilidad por una o más complicaciones asociadas con la hipertensión arterial pulmonar. En algunas modalidades, la morbilidad comprende un cambio en uno o más de los siguientes: mayor necesidad de un trasplante de pulmón y/o corazón; necesidad de iniciar la terapia de rescate con un tratamiento conocido para la HAP; necesidad de aumentar la prostaciclina en al menos un 10 %; necesidad de septostomía auricular; hospitalización específica por HAP durante al menos 24 horas; y deterioro de la HAP. En algunas modalidades, el deterioro de la HAP comprende un empeoramiento de la clase funcional de la OMS y una disminución de la 6MWD de al menos el 15 %. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento reduce el riesgo de muerte asociado con la hipertensión arterial pulmonar. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento reduce el riesgo de muerte asociado con la hipertensión arterial pulmonar en al menos un 10 % (p. ej., 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o al menos 50 %). En algunas modalidades, el paciente tiene un nivel de hemoglobina de >8 y <15 g/dl. En algunas modalidades, los niveles de hemoglobina del paciente son <18 g/dl.

[0150] En ciertas modalidades, el paciente tratado de acuerdo con los métodos descritos en este documento es femenino. En ciertas modalidades, el paciente tratado de acuerdo con los métodos descritos en este documento es masculino. En ciertas modalidades, el paciente tratado de acuerdo con los métodos descritos en este documento puede ser de cualquier edad. En ciertas modalidades, el paciente tratado de acuerdo con los métodos descritos en este documento es menor de 18 años. En una modalidad específica, el paciente tratado de acuerdo con los métodos descritos en este documento tiene menos de 13 años. En otra modalidad específica, el paciente tratado de acuerdo con los métodos descritos en este documento es menor que 12, menor que 11, menor que 10, menor que 9, menor que 8, menor que 7, menor que 6 o menor de 5 años. En otra

modalidad específica, el paciente tratado de acuerdo con los métodos descritos en este documento tiene 1-3 años, 3-5 años, 5-7 años, 7-9 años, 9-11 años, 11-13 años, 13-15 años, 15-20 años, 20-25 años, 25-30 años o más de 30 años. En otra modalidad específica, el paciente tratado de acuerdo con los métodos descritos en este documento tiene 30-35 años, 35-40 años, 40-45 años, 45-50 años, 50-55 años, 55-60 años o más de 60 años. En otra modalidad específica, el paciente tratado de acuerdo con los métodos descritos en este documento tiene entre 18 y 64 años, entre 65 y 74 años o más de 75 años.

[0151] En ciertas modalidades, los niveles de hemoglobina en un paciente tratado de acuerdo con las formas y métodos de dosificación proporcionados en este documento son inferiores a 10 g/dl, 9 g/dl, 8 g/dl o 7 g/dl. En ciertas modalidades, los niveles de hemoglobina en un paciente tratado de acuerdo con las formas y métodos de dosificación proporcionados en el presente documento están entre 7 g/dl y 7,5 g/dl, entre 7,5 g/dl y 8 g/dl, entre 8 g/dl y 8,5 g/dl, entre 8,5 g/dl y 9,0 g/dl, entre 9,0 g/dl y 9,5 g/dl, o entre 9,5 g/dl y 10,0 g/dl.

EJEMPLOS

[0152] La especificación que ahora se describe generalmente, se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen simplemente con fines de ilustración de ciertas modalidades de la presente descripción, y no tienen la intención de limitar la descripción.

[0153] La invención que ahora se describe generalmente, se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen simplemente con fines de ilustración de ciertas modalidades de la invención, y no tienen la intención de limitar la invención.

Ejemplo 1 Proteínas de fusión ActRIIa-Fc

[0154] Se construyó una proteína de fusión de ActRIIa soluble que tiene el dominio extracelular de ActRIIa humano fusionado con un dominio Fc humano o de ratón con un enlazador mínimo en el medio. Los constructos se denominan ActRIIa-hFc y ActRIIa-mFc, respectivamente.

[0155] El siguiente ActRIIa-hFc que se muestra a continuación es sotatercept purificado a partir de líneas celulares CHO (SEQ ID NO: 32):

[0156] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTVGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIV
KQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTP
KPPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVP

KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0157] Las proteínas ActRIIa-hFc y ActRIIa-mFc se expresaron en líneas celulares CHO. Se consideraron tres secuencias de líderes diferentes:

[0158] i) Melitina de abeja melífera (HBML): MKFLVNVALVFMVYISYIYA (SEQ ID NO: 33)

[0159] (ii) Activador tisular del plasminógeno (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 34)

[0160] (iii) Nativo: MGAAAKLAFVFLISCSSGA (SEQ ID NO: 35).

[0161] La forma seleccionada emplea el TPA líder y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos sin procesar:

[0162] MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGV
EPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCE
GNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 36)

[0163] Esta proteína está codificada por la siguiente secuencia de ácidos nucleicos:

[0164] ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCA
GTCTTCGTTTCGCCCCGGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTT
TTTAAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTTGAACCGTGTTA
TGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTC
CATTGAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACT
GATTGTGTAGAAAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGAGGGCAAT
ATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCGGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCA
AATCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGGAACACACATGCCACCGTGC
CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAG
GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA
TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCG
TCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT
CCAACAAAGCCCTCCCAGTCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAG
CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAA

CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC
AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA
CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGAATTC (SEQ ID NO: 37)

[0165] Tanto ActRIIa-hFc como ActRIIa-mFc fueron notablemente susceptibles a la expresión recombinante. Como se muestra en **las Figuras 3A y 3B**, la proteína se purificó como un pico único y bien definido de proteína. La secuenciación N-terminal reveló una sola secuencia de – ILGRSETQE (SEQ ID NO: 38). La purificación podría lograrse mediante una serie de pasos de cromatografía en columna, que incluyen, p. ej., tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de sefarosa Q, cromatografía de fenilsefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación podría completarse con filtración viral e intercambio de tampones. La proteína ActRIIa-hFc se purificó a una pureza del >98 % según lo determinado por cromatografía de exclusión por tamaño y del >95 % según lo determinado por SDS PAGE.

[0166] ActRIIa-hFc y ActRIIa-mFc mostraron una alta afinidad por los ligandos. GDF11 o activina A se inmovilizaron en un chip Biacore™ CM5 utilizando el procedimiento estándar de acoplamiento de aminas. Las proteínas ActRIIa-hFc y ActRIIa-mFc se cargaron en el sistema y se midió la unión. ActRIIa-hFc unido a activina con una constante de disociación (K_D) de 5×10^{-12} y unido a GDF11 con un K_D de $9,96 \times 10^{-9}$. Véanse **las figuras 4A y 4B**. Utilizando un ensayo de unión similar, se determinó que ActRIIa-hFc tenía una afinidad alta a moderada por otros ligandos de la superfamilia TGF-beta, incluidos, p. ej., la activina B, GDF8, BMP6 y BMP10. ActRIIa-mFc se comportó de manera similar.

[0167] El ActRIIa-hFc fue muy estable en estudios farmacocinéticos. A las ratas se les administró 1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg de proteína ActRIIa-hFc, y los niveles plasmáticos de la proteína se midieron a las 24, 48, 72, 144 y 168 horas. En un estudio separado, las ratas recibieron dosis de 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg. En ratas, ActRIIa-hFc tuvo una vida media sérica de 11 a 14 días, y los niveles circulantes del fármaco fueron bastante altos después de dos semanas (11 µg/ml, 110 µg/ml o 304 µg/ml para administraciones iniciales de 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg, respectivamente). En monos cynomolgus, la vida media plasmática fue sustancialmente mayor de 14 días, y los niveles circulantes del fármaco fueron de 25 µg/ml, 304 µg/ml o 1440 µg/ml para las administraciones iniciales de 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg, respectivamente.

Ejemplo 2 Caracterización de una proteína ActRIIa-hFc

[0168] La proteína de fusión de ActRIIa-hFc se expresó en células CHO-DUKX B11 transfectadas de manera estable a partir de un vector pAID4 (SV40 ori/enhancer, promotor de CMV), utilizando una secuencia líder de plasminógeno tisular del SEQ ID NO: 34. La proteína, purificada como se describe anteriormente en el Ejemplo 1, tenía una secuencia del SEQ ID NO: 32. La porción Fc es una secuencia Fc de IgG1 humana, como se muestra en SEQ ID NO: 32. El análisis de proteínas revela que la proteína de fusión de ActRIIa-hFc se forma como un homodímero con enlace disulfuro.

[0169] El material expresado por células CHO tiene una mayor afinidad por el ligando de activina B que la reportada por una proteína de fusión de ActRIIa-hFc expresada en células humanas 293 (ver, del Re et al. (2004) J Biol Chem. 279 (51): 53126-53135). Además, el uso de la secuencia líder TPA proporcionó una mayor producción que otras secuencias líderes y, a diferencia de ActRIIa-Fc expresado con un líder nativo, proporcionó una secuencia N-terminal de alta pureza. El uso de la secuencia líder nativa dio como resultado dos especies principales de ActRIIa-Fc, cada una con una secuencia N-terminal diferente.

[0170] Las trampas de ligandos de ActRIIa adicionales (proteínas de fusión ActRIIa-Fc modificadas para reducir la proporción de unión a la activina A en relación con la miostatina o GDF11) se describen en las publicaciones de solicitud internacional de patente Nos. WO 2006/012627 y WO 2007/062188, incorporadas por referencia en este documento.

Ejemplo 3 Preparación de una formulación de proteína de fusión de ActRIIa-hFc liofilizada

[0171] Inicialmente, la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 (sotatercept) se formuló por primera vez en solución salina tamponada con fosfato como solución congelada. Sobre la base de los estudios de desarrollo posteriores realizados, se desarrolló una formulación amortiguador de citrato liofilizado de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 que contiene sacarosa y polisorbato 80, para permitir una formulación estable con una vida útil adecuada para la comercialización.

[0172] Se desarrollaron dos formulaciones de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32, 45 mg/vial y 60 mg/vial. La formulación de 45 mg/vial contenía 55,0 mg del SEQ ID NO: 32 o una variante del SEQ ID NO: 32 que carecía del residuo de lisina C-terminal, 0,48 mg de ácido cítrico monohidratado, 2,56 mg de citrato trisódico dihidratado, 0,22 mg de polisorbato 80 y 88,0 mg de sacarosa. La formulación de 60 mg/ml contenía 72,5 mg del SEQ ID NO: 32 o una variante del SEQ ID NO: 32 que carecía del residuo de lisina C-terminal, 0,64 mg de ácido cítrico monohidratado, 3,37 mg de citrato trisódico dihidratado, 0,29 mg de polisorbato 80 y 116,0 mg de sacarosa. Las formulaciones tienen una composición idéntica antes de la liofilización y tras la reconstitución con agua para inyección estéril. Se diferencian solo en sus

volúmenes de llenado. El vial de 45 mg tiene un volumen de llenado de 1,1 ml, mientras que el vial de 60 mg tiene un volumen de llenado de 1,45 ml. Ambas formulaciones están liofilizadas y se reconstituyen antes de la administración subcutánea. El vial de 45 mg se reconstituye con 1,0 ml de agua para inyección estéril y el de 60 mg/vial con 1,3 ml de agua para inyección estéril.

[0173] El desarrollo de la formulación de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 se guió por los resultados de varios estudios de detección que se describen a continuación. Estos estudios se centraron en la selección del pH, el sistema de amortiguador, la concentración de proteínas y los excipientes óptimos para la estabilización de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32. Los estudios de cribado se realizaron en condiciones aceleradas o estresadas para observar diferencias en la estabilidad de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 en las muestras de prueba.

[0174] *Estudio preliminar de cribado de pH: Evaluación temprana e identificación de un amortiguador y rango de pH adecuados para la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 para una estabilidad biofísica y una capacidad de unión óptimas*

[0175] Se realizó un tamizaje inicial y un tamiz de pH para comprender el impacto del pH y el sistema de amortiguador en la estabilidad de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32. En este estudio, la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 se formuló a una concentración de 5 mg/ml en acetato, citrato, histidina, fosfato, succinato y tampones tris a una concentración de 50 mM, con niveles de pH que oscilan entre 4 y 8. Estas formulaciones se llenaron en viales de vidrio Tipo I y se colocaron en estabilidad a corto plazo a 5 °C, 25 °C y 45 °C durante un máximo de 6 meses y se analizó su pureza mediante cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HP-SEC), la estabilidad térmica mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y la actividad de unión mediante resonancia de plasma de superficie (Biacore). Los datos de estos análisis se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Estudio preliminar de detección de pH 1: Efecto del amortiguador y el pH en el % de especies de monómeros por HP-SEC, Tm1 por DSC, Kd por Biacore

Sistema amortiguador	Tm 1 (°C)	Punto en el tiempo (meses, m); Monómero (%)							Punto en el tiempo (meses, m); K _d (pM)					
		Inicia l	5 °C		25 °C		45 °C		Inicia l	5 °C	25 °C		45 °C	
			3M	6 M	3M	6 M	1 M	2 M		6 M	2 M	6 M	1 M	2 M
Acetato, pH 4,0	55,6	99,7	99,9	99,7	99,8	99,8	89,4	88,4	8,4	21,1	47	192	127	272
Acetato, pH 4,5	59,7	99,7	99,9	99,7	99,8	99,8	95,3	91,7	8,0	17,1	41	115	138	184
Acetato, pH 5,0	63,1	99,8	99,9	100,0	99,8	100,0	99,4	96,0	7,5	11,3	23	50,0	77,5	186

Sistema amortiguador	Tm 1 (°C)	Punto en el tiempo (meses, m); Monómero (%)							Punto en el tiempo (meses, m); K _d (pM)					
		Inicia l	5 °C		25 °C		45 °C		Inicia l	5 °C	25 °C		45 °C	
			3M	6 M	3M	6 M	1 M	2 M		6 M	2 M	6 M	1 M	2 M
Acetato, pH 5,5	66,8	99,8	99,9	100,0	99,9	100,0	99,8	97,9	9,7	10,6	13	23,2	41,8	53,4
Citrato, pH 4,5	57,9	99,8	99,9	99,8	99,9	99,8	85,2	66,2	9,2	16,4	46	181	251	24,9
Citrato, pH 5,0	64,0	99,8	99,9	100,0	99,9	99,7	98,6	94,3	9,9	13,0	29	70,0	307	84,2
Citrato, pH 5,5	66,2	99,8	99,9	100,0	99,9	100,0	99,8	97,8	10,7	10,1	13	27,3	46,4	56,2
Citrato, pH 6,0	68,5	99,8	99,9	100,0	99,9	100,0	99,8	97,2	9,4	9,7	11	17,7	21,5	33,0
Citrato, pH 6,5	69,4	99,8	99,9	100,0	99,9	100,0	99,1	96,7	10,0	11,5	8,6	12,4	13,4	8,3
Citrato, pH 7,0	69,5	99,8	99,9	100,0	99,9	98,1	99,0	93,7	9,4	8,4	7,2	13,1	11,5	18,0
Histidina, pH 5,5	62,7	99,8	99,9	100,0	99,9	100,0	99,6	96,3	10,9	10,9	14	31,3	82,4	170
Histidina, pH 6,0	65,8	99,8	99,9	100,0	99,9	100,0	99,8	97,6	10,4	10,5	11	20,2	50,7	55,3
Histidina, pH 6,5	67,5	99,8	99,9	100,0	98,8	98,3	99,9	90,0	9,3	8,8	9,3	14,9	29,2	32,0
Histidina, pH 7,0	67,8	99,8	99,9	100,0	99,9	98,0	99,9	88,8	8,7	8,3	10	16,0	21,0	29,3
Histidina, pH 7,4	67,9	99,8	99,9	100,0	99,9	95,9	100,0	87,1	10,1	9,4	9,1	15,9	19,2	26,2
Fosfato, pH 5,8	69,1	99,8	99,9	100,0	99,9	100,0	99,8	97,7	8,0	9,8	10	19,3	34,7	41,8
Fosfato, pH 6,3	69,4	99,8	99,9	100,0	99,9	100,0	99,8	97,0	9,0	10,7	11	15,8	20,6	27,7
Fosfato, pH 6,8	69,9	99,8	99,9	99,6	99,9	96,7	98,3	94,3	10,0	8,6	6,5	11,9	15,5	16,7
Fosfato, pH 7,3	70,2	99,8	99,8	100,0	99,9	95,8	92,3	87,9	10,0	10,0	7,3	8,6	13,8	20,7
Fosfato, pH 7,8	70,0	99,8	99,9	100,0	99,5	90,4	87,7	63,7	9,0	9,4	7,7	12,9	17,7	18,0
Succinato, pH 4,5	59,4	99,8	99,8	99,7	99,8	99,7	95,2	91,5	9,5	18,3	42	114,0	108	65,8
Succinato, pH 5,0	64,0	99,8	99,8	100,0	99,9	99,8	99,5	95,4	12,1	13,8	25	48,9	73,4	106
Succinato, pH 5,5	67,1	99,8	99,8	100,0	99,8	99,8	99,8	96,4	10,5	10,8	15	25,0	31,6	65,6
Succinato, pH 6,0	68,6	99,8	99,9	100,0	99,8	99,8	99,7	95,9	11,5	5,8	8,4	12,0	17,7	5,7
Succinato, pH 6,5	69,5	99,8	99,9	100,0	99,7	99,7	98,8	96,2	9,8	10,4	7,6	10,2	10,9	14,3
Tris, pH 7,0	68,9	99,8	99,9	100,0	99,9	97,3	99,8	97,1	9,7	8,4	6,5	11,3	12,6	25,3
Tris, pH 7,3	69,2	99,8	99,9	100,0	99,9	97,1	98,1	96,4	11,2	8,1	10	9,3	11,1	24,5

Sistema amortiguador	Tm 1 (°C)	Punto en el tiempo (meses, m); Monómero (%)							Punto en el tiempo (meses, m); K _d (pM)					
		Inicia l	5 °C		25 °C		45 °C		Inicia l	5 °C	25 °C		45 °C	
			3M	6 M	3M	6 M	1 M	2 M		6 M	2 M	6 M	1 M	2 M
Tris, pH 7,5	69,1	99,8	99,9	99,3	99,8	95,8	99,2	95,3	10,6	10,7	8,1	10,8	15,5	19,8
Tris, pH 7,8	69,0	99,8	99,9	100	99,9	95,7	99,0	94,6	10,5	6,8	9,8	12,3	10,9	21,3
Tris, pH 8,0	69,0	99,8	99,9	100	99,8	95,7	98,9	94,0	9,6	7,4	10	12,7	10,4	22,6

[0176] La observación de los cambios en el % de especies de monómeros (pureza) por HP-SEC reveló que no hubo cambios significativos en la pureza después de 6 meses a 5 °C y que todas las formulaciones conservaron >99,0 % de monómero. Después de 6 meses a 25 °C hubo una disminución significativa en el % de monómero para formulaciones con un pH $\geq 6,5$, mientras que no hubo cambios significativos para ninguna formulación por debajo de pH 6,5 como se muestra en **la Figura 5**. Después de 2 meses a 45 °C, hubo una disminución similar en el % de monómero para formulaciones con pH $\geq 6,5$, pero también hubo una disminución del % de monómero correlacionado con un pH más bajo <5,5.

[0177] Sobre la base de estas observaciones en condiciones aceleradas (25 °C) y estresadas (45 °C), la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 en amortiguador de citrato y succinato en el rango de pH de 5,5 a 6,5 tuvo el mayor efecto estabilizante. La histidina a pH 5,5 - 6,0 también tuvo una estabilidad similar al citrato y succinato a pH más bajo y menos estable a pH más alto.

[0178] La afinidad de unión generalmente se mide mediante la constante de disociación de equilibrio (K_d), que se utiliza para evaluar y clasificar las fortalezas de orden de las interacciones bimoleculares. En este caso, se utilizó la interacción o afinidad de unión de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 con su activina diana de Biacore como medida de estabilidad del producto. Cuanto menor sea el valor de K_d, mayor será la afinidad de unión del ligando por su objetivo.

[0179] No hubo cambios significativos en la constante de disociación de equilibrio (K_d) del SEQ ID NO: 32 después de 6 meses a 5 °C. Después de 6 meses a 25 °C para formulaciones con un pH < 5,5, hubo una disminución significativa en la unión, como lo demuestra un fuerte aumento en los valores de K_d en **la Figura 6**. Las formulaciones con pH < 6,0 tuvieron una disminución de la unión después de 2 meses a 45 °C

[0180] Sobre la base de estas observaciones, la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 puede conservar su afinidad de unión a pH $\geq 5,5$ en muchos sistemas amortiguadores diferentes.

[0181] La temperatura de despliegue de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 aumentó constantemente con el pH, estabilizándose cerca de 67 °C - 70 °C aproximadamente pH $\geq$ 5,5. Todos los tampones con valores de pH equivalentes funcionaron de manera idéntica, excepto los sistemas histidina y tris que tienen puntos de fusión significativamente más bajos.

[0182] En su totalidad, los resultados de este experimento sugirieron que un rango de pH de 5,5 a 6,5 sería el rango óptimo para el SEQ ID NO: 32 en términos de estabilidad física monitoreada por HP-SEC y retención de afinidad de unión por Biacore. Además, los sistemas amortiguadores de citrato y succinato funcionaron mejor que la histidina en el extremo superior de este rango. Además, los tampones de acetato y fosfato no se siguieron desarrollando debido a la posibilidad de cambios de pH debido a la precipitación durante la congelación o liofilización.

[0183] *Determinación de la concentración óptima de amortiguador: Evaluación del efecto de la concentración de amortiguador con uno de los principales sistemas amortiguadores, citrato, sobre la estabilidad conformacional y coloidal de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32*

[0184] En el estudio inicial de detección de pH, se evaluaron una variedad de sistemas amortiguadores a una concentración de 50 mM para proporcionar una alta capacidad de amortiguador. Sin embargo, esta concentración puede no ser óptima para estabilizar la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 y no es ideal para inyecciones subcutáneas donde se sabe que una mayor fuerza iónica del amortiguador, especialmente del citrato, causa dolor por inyección. En este estudio, se preparó la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 en un rango de concentraciones de amortiguador de citrato, uno de los sistemas amortiguadores principales del estudio anterior. Amortiguador de citrato (5-50 mM) a pH 5,8 con 50 mg/ml de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 y sacarosa al 8 % (peso/volumen) se evaluaron para determinar el efecto de la fuerza del amortiguador sobre la estabilidad térmica utilizando DSC y el parámetro de interacción de difusión (kD) por DLS, que es una medida de la propensión de una molécula a autoasociarse. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2: Estudio de rango de concentración de amortiguador: Efecto de la concentración del amortiguador en los puntos de fusión y kD

Citrato (mM)	Tm1 (°C)	kD (ml/g)
5	67,9	6,7
10	68,8	7,4
25	69,0	1,4
50	68,8	-4,5

[0185] Los resultados del estudio mostraron que la mayor constante de disociación (kD) de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 fue a 10 mM (+6,7 ml/g) y disminuiría con concentraciones más altas hasta 50 mM, lo que resultó en un kD negativo (-4,5 ml/g). El valor kD más positivo de una molécula indica una repulsión más fuerte entre moléculas, lo que es indicativo de una mejor estabilidad coloidal, mientras que un valor kD negativo indica una propensión a autoasociarse que puede conducir a la agregación. Además, los puntos de fusión de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 fueron en gran medida idénticos y suficientemente altos para todas las concentraciones de amortiguador. Con base en estos datos, se eligió una concentración de amortiguador 10 mM para el desarrollo posterior de la formulación.

Selección del pH de estabilidad óptima

[0186] Se realizó un estudio de estabilidad a corto plazo en el que la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 se formuló a una concentración de 5 mg/ml en succinato, citrato e histidina a una concentración 10 mM con niveles de pH que oscilaron entre 5 y 7. Estas formulaciones se llenaron en viales de vidrio Tipo I y se colocaron en estabilidad a corto plazo a 5 °C, 25 °C y 40 °C durante un máximo de 3 meses. Las formulaciones se analizaron mediante métodos biofísicos para determinar su pureza mediante cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución (HP-SEC), la estabilidad térmica mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), la fragmentación por CE-SDS no reducida, la degradación química por iCIEF desialilado y el pH. Los datos de estos análisis se resumen en la Tabla 3, la Tabla 4 y la Tabla 5 y se hicieron las siguientes observaciones:

Tabla 3: Estudio de selección de pH de estabilidad óptima: Efecto del amortiguador y el pH en % de HMW, monómero y % de especies de LMW por HP-SEC, Tm1 por DSC

Sistema amortiguador	DS C	Punto en el tiempo (meses, m); HMW (%)				Punto en el tiempo (meses, m); Monómero (%)				Punto en el tiempo (meses, m); LMW (%)			
		Inicial	5 °C	25 °C	40 °C	Inicial	5 °C	25 °C	40 °C	Inicial	5 °C	25 °C	40 °C
			3M	3M	3M		3M	3M	3M		3M	3M	3M
Succinato pH 5,0	61,2	0,7	0,5	0,5	N/A	98,7	98,9	98,4	N/A	0,7	0,6	1,0	N/A
Succinato pH 5,5	65,3	0,5	0,5	0,5	0,7	98,9	99,0	98,7	96,1	0,7	0,6	0,9	3,1
Succinato pH 6,0	68,1	0,5	0,4	0,4	0,5	98,9	99,0	98,7	96,3	0,6	0,5	0,9	3,3
Succinato pH 6,5	69,7	0,5	0,5	0,4	0,4	98,9	99,0	98,6	95,5	0,6	0,6	1,0	4,1
Citrato pH 5,0	61,7	0,5	0,5	0,5	1,5	98,9	99,0	98,5	95,0	0,6	0,5	1,0	3,6
Citrato pH 5,5	65,4	0,5	0,5	0,4	0,7	98,9	99,1	98,7	96,2	0,6	0,5	0,9	3,2

Sistema amortiguador	DS C	Punto en el tiempo (meses, m); HMW (%)				Punto en el tiempo (meses, m); Monómero (%)				Punto en el tiempo (meses, m); LMW (%)			
		Inicial	5 °C	25 °C	40 °C	Inicial	5 °C	25 °C	40 °C	Inicial	5 °C	25 °C	40 °C
			3M	3M	3M		3M	3M	3M		3M	3M	3M
Citrato pH 6,0	68,6	0,5	0,4	0,4	0,5	98,9	99,1	98,7	96,1	0,6	0,5	0,9	3,4
Citrato pH 6,5	70,0	0,5	0,5	0,4	0,4	99,0	99,0	98,6	95,1	0,6	0,5	1,0	4,5
Citrato pH 7,0	70,4	0,5	0,5	0,4	0,4	98,9	99,0	98,4	93,8	0,6	0,5	1,2	5,8
Histidina pH 5,5	60,9	0,5	0,5	0,4	1,1	98,9	99,1	98,7	95,6	0,6	0,5	0,9	3,3
Histidina pH 6,0	63,7	0,5	0,4	0,3	0,5	99,0	99,1	98,8	96,3	0,6	0,5	0,9	3,1
Histidina pH 6,5	66,3	0,5	0,4	0,3	0,3	99,0	99,1	98,7	96,4	0,6	0,5	1,0	3,3
Histidina pH 7,0	66,9	0,5	0,4	0,3	0,3	99,0	99,0	98,7	96,1	0,6	0,6	1,0	3,6

Tabla 4: Estudio de selección de pH de estabilidad óptima: Efecto del amortiguador y el pH en % de pico menor y % de especies de pico mayor por CE-SDS NR

Sistema amortiguador	pH	Punto en el tiempo (meses, m); Pico menor (%)				Punto en el tiempo (meses, m); Pico mayor (%)			
		Inicial	5 °C	25 °C	40 °C	Inicial	5 °C	25 °C	40 °C
	Inicial		1 M	1 M	1 M		1 M	1 M	1 M
Succinato pH 5,0	5,0	1,9	2,2	3,4	6,3	98,0	97,7	96,6	93,8
Succinato pH 5,5	5,5	1,9	2,2	2,3	4,5	98,0	97,8	97,7	95,4
Succinato pH 6,0	5,9	2,0	2,8	2,4	3,2	98,0	97,1	97,6	96,8
Succinato pH 6,5	6,5	2,2	2,3	2,4	3,4	97,8	97,7	97,6	96,7
Citrato pH 5,0	4,9	3,5	2,2	3,4	6,9	96,5	97,9	96,6	93,0
Citrato pH 5,5	5,4	3,4	2,4	3,0	3,5	96,5	97,6	97,0	96,4
Citrato pH 6,0	5,7	2,1	1,8	2,4	4,1	97,9	98,2	97,6	95,9
Citrato pH 6,5	6,3	1,9	1,8	2,1	2,9	98,1	98,1	97,9	97,0
Citrato pH 7,0	6,7	1,7	2,1	2,1	3,6	98,3	97,9	97,9	96,3
Histidina pH 5,5	5,7	1,9	2,1	2,8	4,5	98,1	97,8	97,2	95,4
Histidina pH 6,0	6,1	1,9	2,0	1,9	3,3	98,1	98,0	98,1	96,7
Histidina pH 6,5	6,6	1,8	2,0	2,1	3,2	98,3	98,0	97,8	96,8
Histidina pH 7,0	6,9	2,0	2,3	2,3	3,4	98,0	97,6	97,8	96,5

Tabla 5: Estudio de selección de pH de estabilidad óptima: efecto del amortiguador y el pH en % de especies ácidas, % de especies básicas y % de especies principales totales por icIEF desialilado

Sistema amortiguador	Punto en el tiempo (meses, m); Especies ácidas (%)				Punto en el tiempo (meses, m); Total de especies principales (%)				Punto en el tiempo (meses, m); Especies básicas (%)			
	Inicial	5 °C	25 °C	40 °C	Inicial	5 °C	25 °C	40 °C	Inicial	5 °C	25 °C	40 °C
		3M	3M	3M		3M	3M	3M		3M	3M	3M
Succinato pH 5,0	19,6	18,5	12,3	DNT	64,1	65,3	50,9	DNT	16,4	16,2	36,8	DNT
Succinato pH 5,5	17,2	17,8	15,1	13,9	65,8	67,3	60,8	45,1	17,0	15,0	24,1	41,0
Succinato pH 6,0	16,8	16,2	16,4	19,1	65,5	69,7	65,3	53,6	17,7	14,1	18,3	27,3
Succinato pH 6,5	17,3	17,3	17,9	DNT	65,1	67,7	66,5	DNT	17,6	15,1	15,6	DNT
Citrato pH 5,0	18,1	15,7	11,6	16,3	64,1	65,5	51,2	28,6	17,7	18,8	37,3	55,1
Citrato pH 5,5	17,7	16,6	14,9	24,0	65,2	68,4	59,8	37,5	17,1	15,0	25,3	38,4
Citrato pH 6,0	17,5	16,3	15,7	22,2	64,9	69,1	65,9	52,1	17,6	14,7	18,4	25,7
Citrato pH 6,5	17,6	17,4	18,0	26,8	65,1	69,0	66,3	55,0	17,2	13,6	15,7	18,2
Citrato pH 7,0	18,2	18,7	18,1	36,0	64,9	69,1	68,0	49,6	16,9	12,3	13,8	14,4
Histidina pH 5,5	19,1	18,9	16,0	13,7	64,2	68,0	59,4	31,4	16,7	13,1	24,6	54,9
Histidina pH 6,0	17,6	17,8	16,0	13,1	65,6	69,5	64,8	47,7	16,8	12,8	19,2	39,2
Histidina pH 6,5	17,0	17,8	17,5	19,6	66,0	69,1	66,9	53,2	17,0	13,1	15,6	27,1
Histidina pH 7,0	17,8	20,0	19,9	26,2	65,3	67,6	65,7	53,8	17,0	12,4	14,4	20,0

[0187] Los resultados de este estudio, como se muestra en **la Figura 7**, mostraron que el citrato y el succinato tienen un rendimiento comparable entre pH 5,3 y 6,3 (pH medido) para una mejor estabilidad térmica con respecto a HP-SEC basado en resultados de estabilidad de 25 °C. Las mayores cantidades de fragmentación (LMW%) observadas por HP-SEC a 40 °C en los sistemas amortiguadores de citrato y succinato se atribuyeron a la naturaleza del estrés y a los desafíos de integración de métodos. Las observaciones realizadas con HP-SEC también fueron consistentes con los datos no reducidos de CE-SDS que se muestran en **la Figura 8**. La caracterización del perfil de carga mediante icIEF desialilado que se muestra en **la Figura 9**, también confirmó que el rango de pH de estabilidad óptima está entre 5,3 y 6,3. La formulación en amortiguador de histidina requiere un rango de pH ligeramente más alto entre 6,0 y 6,5 para tener un rendimiento

comparable al citrato y el succinato; sin embargo, este Sistema amortiguador también exhibió un Tm1 más bajo, lo que indica una menor estabilidad biofísica.

[0188] Los resultados de este estudio demostraron que la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 es biofísica y químicamente estable en el rango de 5,3 a 6,3 (pH medido) tanto en tampones de citrato como de succinato. Además, este rango ofrecía el potencial de disminuir la tasa de posible desamidación al seleccionar un pH que es de naturaleza menos básica, como se observa típicamente con los productos biológicos. Por lo tanto, se seleccionó un pH objetivo de 5,8 con citrato como sistema amortiguador para un mayor desarrollo del producto.

Estabilidad física de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32

[0189] Se realizó un estudio para evaluar la estabilidad física de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 bajo estrés físico por agitación en ausencia de excipientes en uno de los sistemas principales de amortiguador, citrato 10 mM, como el peor de los casos. La proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 se diluyó a concentraciones de 5 y 50 mg/ml en citrato 10 mM, pH 5,8. Las dos formulaciones se agitaron junto con muestras de "control" no agitadas, donde se llenaron 4 ml de muestra en viales de vidrio tipo I de 10 ml con un agitador analógico durante un máximo de 4 días y se analizó la pérdida de monómero por HP-SEC y se resumió en la Tabla 6.

Tabla 6 Estabilidad física por agitación e impacto del monómero (%)

Concentración de proteínas (mg/ml)	Condición	Punto en el tiempo; Monómero (%)				
		0	1 hora	4 horas	8 horas	4 días
5	agitación	99,3	99,4	99,4	99,5	99,6
5	control	99,4	99,4	99,4	99,5	99,3
50	agitación	99,5	99,4	99,4	99,4	99,3
50	control	99,4	99,4	99,2	99,4	99,0

[0190] No se observó ningún cambio significativo en el contenido de monómeros entre las muestras de control y estresadas durante un máximo de 4 días de agitación, independientemente de la concentración de proteínas. Los resultados de este estudio sugieren que incluso en ausencia de un azúcar de volumen y un tensioactivo, la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 es biofísicamente estable contra el cizallamiento y el estrés interfacial.

Estudio de rango de concentración para la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32

[0191] Se realizó un estudio para evaluar la estabilidad biofísica a corto plazo de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 a varias concentraciones. la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 se preparó de 20 mg/ml a 200 mg/ml en amortiguador de citrato

10 mM, pH 5,8 sin ningún otro excipiente y se llenó en viales de vidrio tipo I y se colocó en estabilidad a corto plazo a 5 °C y 25 °C durante un máximo de 7 días. La pureza de las formulaciones se midió mediante análisis HP-SEC en el transcurso del estudio y se resumió en la Tabla 7.

Tabla 7 Datos de HP-SEC para el estudio de rango de concentración

Concentración de proteínas (mg/ml)	Punto en el tiempo (días, D); Monómero (%)							
	5 °C				25 °C			
	Inicial	1D	3D	7D	Inicial	1D	3D	7D
200	99,6	99,6	99,4	99,4	99,5	99,3	98,8	98,7
150	99,6	99,6	99,5	99,5	99,6	99,5	99,2	99,1
100	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,4	99,3
75	99,7	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,5	99,5
50	99,6	99,7	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,5
20	99,6	99,7	99,2	99,7	99,7	99,7	99,6	99,6

[0192] No hubo cambios significativos en la pureza de ninguna de las formulaciones mientras se almacenaban a 5 °C durante un máximo de 7 días. Sin embargo, se observó que las concentraciones superiores a 75 mg/ml tenían una mayor pérdida de monómeros durante el almacenamiento a corto plazo a 25 °C y esta tendencia continuó con el aumento de la concentración hasta 200 mg/ml, como se muestra en la **Figura 10**. Los resultados de este estudio demostraron que las concentraciones de proteínas a 75 mg/ml o menos tuvieron un impacto insignificante en la estabilidad biofísica de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32. Por lo tanto, se eligió que la concentración objetivo de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 fuera de ≤ 75 mg/ml según el estudio de agitación y rango de concentración.

Evaluación de la estabilidad a largo plazo de los amortiguadores principales para apoyar la composición de sustancias farmacológicas

[0193] Se realizó un estudio de estabilidad a largo plazo para comparar el rendimiento de dos sistemas amortiguadores a dos concentraciones diferentes (basado en la comprensión temprana de la necesidad de dosificación clínica). la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 se preparó a 75 y 50 mg/ml en succinato 10 mM y citrato 10 mM a pH 5,8 y se llenó en viales de vidrio tipo I y se almacenó a -80 °C, -20 °C, 5 °C y 25 °C durante un máximo de 30 meses en cada condición de almacenamiento.

[0194] Los datos de estabilidad mediante el análisis HP-SEC se proporcionan en la Tabla 8 y se realizan las siguientes observaciones:

Tabla 8 Datos HP-SEC para la estabilidad a largo plazo de los amortiguadores principales

Concentración de proteínas (mg/ml)	Sistema amortiguador	Punto en el tiempo (meses, m); Monómero (%)								
		Inicial	-80 °C			5 °C			25 °C	
			6 M	12 M	24 M	6 M	12 M	24 M	6 M	12 M
75	Citrato 10 mM, pH 5,8	97,9	98,2	98,1	98,2	96,0	95,7	94,6	93,3	91,2
50	Citrato 10 mM, pH 5,8	98,0	98,1	98,4	98,2	96,6	96,7	95,8	94,8	93,4
75	Succinato 10 mM, pH 5,8	97,5	98,3	97,9	98,6	95,5	94,4	93,2	91,8	90,1
50	Succinato 10 mM, pH 5,8	97,5	97,8	98,0	97,8	96,4	95,6	94,4	94,0	92,2

[0195] No hubo cambios significativos en la pureza de HP-SEC después de 24 meses a -80 °C y todas las formulaciones conservaron $\geq 97,8$ % de monómero. Después de 24 meses a 5 °C, la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 disminuyó en monómero al 94 - 95 % para formulaciones de citrato y 93 - 94 % para formulaciones de succinato. Estos resultados demuestran que la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 es biofísicamente estable como solución incluso en ausencia de cualquier tensioactivo o azúcar estabilizante, ya que ninguna de las formulaciones tuvo una pérdida de monómero por debajo del 94 % de monómero incluso después de 2 años a 2-8 °C. Después de 12 meses a 25 °C, la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 disminuyó en monómero a 91 - 93 % para formulaciones de citrato y 90 - 92 % para formulaciones de succinato. Tanto en los datos de almacenamiento de 5 °C como en los de 25 °C, la sustancia farmacológica de 75 mg/ml se degradó ligeramente más que cuando se disputó a 50 mg/ml para cada sistema amortiguador, como se esperaba, y estas tendencias se muestran en **la figura 11**.

[0196] En conclusión, los datos de este estudio demuestran que la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 en el amortiguador de citrato tiene una estabilidad a largo plazo ligeramente mejor que el amortiguador de succinato a 5 °C y 25 °C de almacenamiento, pero es idéntica a -80 °C, que es la condición de almacenamiento recomendada. Por lo tanto, se eligió citrato 10 mM a pH 5,8 como formulación objetivo para el SEQ ID NO: 32 DS en condiciones de congelación.

Estudio de rango de concentración de sal

[0197] La proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 se preparó en un rango de concentraciones de cloruro de sodio de 0 a 150 mM en citrato 10 mM pH 5,8 a 50 mg/ml la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 con sacarosa al 8 % (peso/volumen) para evaluar el efecto de la fuerza del amortiguador en sus propiedades biofísicas. Estas formulaciones fueron evaluadas por su estabilidad térmica utilizando DSC y su parámetro de interacción de difusión (kD) por DLS. Los resultados se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9: Estudio de rango de concentración de sal: efecto del cloruro de sodio en el punto de fusión y parámetro de interacción de difusión (kD)

Cloruro de sodio (mM)	DSC	DLS
	Tm1 (°C)	kD (ml/g)
0	69,8	16,2
30	70,1	9,6
50	70,0	5,8
70	70,0	3,5
100	69,8	5,3
150	69,4	4,5

[0198] Los resultados del estudio mostraron que el kD más alto de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 estaba sin cloruro de sodio presente (16,2 ml/g) y disminuiría con concentraciones más altas hasta aproximadamente 5 ml/g estabilizándose en concentraciones superiores a 50 mM. El valor kD de una molécula más positivo indica una repulsión más fuerte entre moléculas, lo que es indicativo de una mejor estabilidad coloidal, lo que sugiere que la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 tiene la mejor estabilidad coloidal sin cloruro de sodio. Además, los puntos de fusión de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 fueron en gran medida idénticos y suficientemente altos para todas las concentraciones de cloruro de sodio. Sobre la base de estos datos, el cloruro de sodio no se consideró adecuado para un mayor trabajo de desarrollo en la estabilización de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32.

Estudio de detección de excipientes

[0199] Se diseñó un estudio de cribado para evaluar una serie de excipientes con el fin de aumentar la estabilidad biofísica de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 en solución. En este cribado de excipientes, la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 se formuló a una concentración de 2 mg/ml con una variedad de excipientes: una sal (cloruro de sodio), azúcares (sacarosa, manitol) y aminoácidos (arginina, histidina). Estas soluciones, como se resume en la Tabla 10, se colocaron en una estabilidad de 5 °C, 25 °C y 45 °C durante un máximo de 12 meses, 9 meses y 3 meses, respectivamente, y posteriormente se probó su pureza (% de contenido de monómero) mediante HP-SEC.

Tabla 10: Estudio de cribado de excipientes: Efecto de los excipientes en el % de especies de monómeros por HP-SEC

Excipiente	Concentración de excipientes	Inicial	12 meses 5 °C	9 meses 25 °C	3 meses 45 °C
Arginina	0,1 % (peso/volumen)	99,7	99,8	99,5	97,8

Excipiente	Concentración de excipientes	Inicial	12 meses 5 °C	9 meses 25 °C	3 meses 45 °C
	0,5 % (peso/volumen)	99,7	99,8	99,6	97,7
	2,0 % (peso/volumen)	99,7	99,8	99,0	97,7
Histidina	0,1 % (peso/volumen)	99,8	99,8	99,2	96,8
	0,5 % (peso/volumen)	99,7	99,8	98,2	94,7
	2,0 % (peso/volumen)	99,7	99,9	96,7	90,5
Manitol	0,1 % (peso/volumen)	99,7	99,8	99,5	98,8
	0,5 % (peso/volumen)	99,7	99,8	99,2	97,9
	2,0 % (peso/volumen)	99,7	99,8	99,3	98,0
Sacarosa	0,1 % (peso/volumen)	99,8	99,8	99,5	97,8
	0,5 % (peso/volumen)	99,8	99,8	99,3	97,9
	2,0 % (peso/volumen)	99,8	99,8	99,5	98,0

[0200] Todas las formulaciones fueron biofísicamente estables a temperaturas de almacenamiento de 5 °C y 25 °C con >99 % de monómero retenido después de 12 meses a 5 °C y 9 meses a 25 °C. Los excipientes evaluados demostraron una estabilidad biofísica comparable en la condición de estrés (45 °C) después de 3 meses reteniendo 97-99 % de monómero, excepto histidina. El aumento de la concentración de histidina se correlacionó con una disminución de la estabilidad biofísica con hasta un 2 % (peso/volumen) de histidina, lo que resultó en un 6 % menos de monómero que la formulación de histidina al 0,1 % (peso/volumen).

[0201] En conclusión, se identificó que la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 era biofísicamente estable en todos los prototipos probados.

Estudio de detección de tensioactivos

[0202] Los tensioactivos se utilizan ampliamente para estabilizar las proteínas de las tensiones interfaciales y de cizallamiento que se encuentran durante la fabricación, el envío y la manipulación. Por lo tanto, se realizaron una serie de experimentos para evaluar el polisorbato 80 (PS80) como tensioactivo para estabilizar SEQ ID NO: 32 en diversas condiciones de estrés.

Estudio 1: Cribado de tensioactivos por estabilidad térmica

[0203] Se realizó un estudio de estabilidad de rango de concentración de PS80 para evaluar el efecto de PS80 en la estabilidad a largo plazo de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32. En este estudio, la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 se formuló a una concentración de 50 mg/ml con niveles variables de PS80 que oscilan entre 0,001 % y 0,05

% en citrato 10 mM a pH 5,8 con sacarosa al 8 % (peso/volumen). Estas formulaciones se llenaron en viales de vidrio Tipo I y se colocaron en estabilidad a 5 °C y 25 °C durante un máximo de 24 meses y a 45 °C durante un máximo de 3 meses. La pureza de las formulaciones fue medida por HP-SEC en el transcurso del estudio para monitorear su estabilidad física. Los datos de estabilidad de HP-SEC se proporcionan en la Tabla 11.

Tabla 11: Rango de concentración de PS80: Efecto de la concentración de PS80 en el % de especies de monómeros en diferentes condiciones de almacenamiento

PS80 (%)	Punto en el tiempo (meses, m); Monómero (%)							
	Inicial	5 °C			25 °C		45 °C	
		6 M	12 M	24 M	12 M	24 M	1 M	3M
0,001	99,5	99,3	99,3	99,2	98,1	96,6	97,7	93,5
0,020	99,5	99,3	99,3	99,2	98,2	96,5	97,8	93,5
0,050	99,5	99,4	99,3	99,2	98,1	96,6	97,8	93,6

[0204] No se observaron diferencias significativas en los perfiles de estabilidad biofísica entre los diferentes niveles de PS80, donde todas las formulaciones tenían >99 % de monómero después de 24 meses a 5 °C, >96 % de monómero después de 24 meses a 25 °C y >93 % de monómero después de 3 meses a 45 °C. Los resultados de este estudio demostraron que la concentración de PS80 entre 0,001 % y 0,05 % era comparable con respecto a la estabilidad biofísica bajo estrés térmico.

Estudio 2: Cribado de tensioactivos por agitación y congelación/descongelación

[0205] Se realizó un estudio adicional de rango de concentración de PS80 para evaluar más a fondo el efecto de PS80 en la estabilización de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 contra el estrés agitación y congelación/descongelación. En este estudio, la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 se formuló a una concentración de 50 mg/ml con niveles variables de PS80 que van de 0 % a 0,05 % en citrato 10 mM a pH 5,8 con sacarosa al 8 % (peso/volumen). Estas formulaciones se llenaron en viales de vidrio Tipo I y se agitaron a 300 RPM durante un máximo de 7 días. Por separado, las formulaciones también se estresaron con hasta 8 ciclos de congelación y descongelación de -80 °C a 25 °C. La pureza de las formulaciones se midió mediante UP-SEC, las partículas por HIAC y MFI, y las variantes de carga por iCIEF desalilado en el transcurso del estudio para monitorear la estabilidad biofísica y química del SEQ ID NO: 32. Los datos de estabilidad se proporcionan en las Tablas 12 a 19.

Tabla 12: Cribado de tensioactivos por agitación: efecto de la concentración de PS80 en el HMW, monómero, LMW por UP-SEC y pico principal por CE-SDS NR

PS80 (%)	UP-SEC									CE-SDS NR		
	Punto en el tiempo (días, D); HMW (%)			Punto en el tiempo (días, D); Monómero (%)			Punto en el tiempo (días, D); LMW (%)			Punto en el tiempo (días, D); Pico mayor (%)		
	Control	3D	7D	Control	3D	7D	Control	3D	7D	Control	3D	7D
0,000	0,8	0,8	0,8	97,3	97,3	97,3	1,9	1,9	1,9	98,1	98,0	98,2
0,005	0,8	0,8	0,8	97,4	97,2	97,3	1,9	2,0	1,9	98,0	98,2	98,4
0,010	0,8	0,8	0,8	97,3	97,3	97,3	1,9	1,9	1,9	98,1	98,2	97,9
0,020	0,8	0,8	0,8	97,3	97,3	97,3	1,9	1,9	1,9	98,0	98,0	98,0
0,030	0,8	0,8	0,8	97,3	97,3	97,3	1,9	2,0	2,0	97,8	98,2	98,0
0,050	0,8	0,8	0,8	97,2	97,3	97,2	2,0	1,9	2,0	97,9	98,1	97,9

Tabla 13: Cribado de tensioactivos por agitación: efecto de la concentración de PS80 sobre el material particulado por MFI

PS80 (%)	Punto en el tiempo (días, D); Partículas $\geq 2 \mu\text{m}$ por ml			Punto en el tiempo (días, D); Partículas $\geq 5 \mu\text{m}$ por ml			Punto en el tiempo (días, D); Partículas $\geq 10 \mu\text{m}$ por ml			Punto en el tiempo (días, D); Partículas $\geq 25 \mu\text{m}$ por ml		
	Control	3D	7D	Control	3D	7D	Control	3D	7D	Control	3D	7D
0,000	173	157	175	40	28	44	14	12	12	0	0	0
0,005	35	35	51	5	7	5	0	5	5	0	0	0
0,010	115	53	88	10	5	12	0	3	3	0	0	3
0,020	39	72	129	7	12	23	3	3	7	0	0	3
0,030	115	65	69	19	23	14	3	12	3	0	0	0
0,050	125	161	129	23	37	37	10	12	7	0	3	0

Tabla 14: Cribado de tensioactivos por agitación: efecto de la concentración de PS80 sobre el material particulado por HIAC

PS80 (%)	Punto en el tiempo (días, D); Partículas $\geq 2 \mu\text{m}$ por ml			Punto en el tiempo (días, D); Partículas $\geq 5 \mu\text{m}$ por ml			Punto en el tiempo (días, D); Partículas $\geq 10 \mu\text{m}$ por ml			Punto en el tiempo (días, D); Partículas $\geq 25 \mu\text{m}$ por ml		
	Control	3D	7D	Control	3D	7D	Control	3D	7D	Control	3D	7D
0,000	77	50	39	15	14	7	5	4	1	1	1	0
0,020	16	34	35	7	8	6	2	2	2	1	0	0

Tabla 15: Cribado de tensioactivos por agitación: efecto de la concentración de PS80 en especies ácidas, especies básicas y especies principales totales por iCIEF desialilado

PS80 (%)	Punto en el tiempo (días, D); Especies ácidas (%)			Punto en el tiempo (días, D); Total de especies principales (%)			Punto en el tiempo (días, D); Especies básicas (%)		
	Control	3D	7D	Control	3D	7D	Control	3D	7D
0,000	22,7	20,8	21,1	67,9	69,3	69,1	9,4	10,0	9,8

PS80 (%)	Punto en el tiempo (días, D); Especies ácidas (%)			Punto en el tiempo (días, D); Total de especies principales (%)			Punto en el tiempo (días, D); Especies básicas (%)		
	Control	3D	7D	Control	3D	7D	Control	3D	7D
0,005	20,7	20,8	22,1	68,3	69,1	68,4	11,1	10,2	9,6
0,010	21,8	22,6	22,7	68,5	67,7	68,5	9,8	9,8	8,9
0,020	20,7	21,5	22,6	69,3	69,1	67,8	10,1	9,5	9,7
0,030	20,9	22,7	23,4	69,3	68,2	68,9	9,9	9,1	7,8
0,050	20,9	21,9	21,0	69,4	68,6	69,3	9,7	9,6	9,9

Tabla 16: Cribado de tensioactivos por congelación/descongelación: efecto de la concentración de PS80 en el HMW, monómero, LMW por datos de UP-SEC, pico principal por CE-SDS no reducido del SEQ ID NO: 32 tras el estrés de congelación y descongelación

PS80 (%)	UP-SEC									CE-SDS NR		
	Ciclos de congelación y descongelación; HMW (%)			Ciclos de congelación y descongelación; Monómero (%)			Ciclos de congelación y descongelación; LMW (%)			Ciclos de congelación y descongelación; Pico mayor (%)		
	0	3	5	0	3	5	0	3	5	0	3	5
0,000	0,8	0,8	0,8	97,3	97,4	97,4	1,9	1,8	1,9	98,0	98,1	98,1
0,010	0,8	0,8	0,8	97,4	97,4	97,4	1,9	1,8	1,8	98,0	98,1	98,1
0,020	0,8	0,8	0,8	97,4	97,3	97,3	1,9	1,9	1,9	98,0	98,2	98,1
0,030	0,8	0,8	0,8	97,3	97,3	97,3	2,0	1,9	1,9	98,1	98,2	98,0

Tabla 17: Cribado de tensioactivos por congelación/descongelación: efecto de la concentración de PS80 en las variantes de carga por iCIEF desialilado del SEQ ID NO: 32 tras el estrés de congelación y descongelación

PS80 (%)	Ciclos de congelación y descongelación; Especies ácidas (%)			Ciclos de congelación y descongelación; Total de especies principales (%)			Ciclos de congelación y descongelación; Especies básicas (%)		
	0	3	5	0	3	5	0	3	5
0,000	21,4	22,0	20,4	68,7	68,4	69,2	9,9	9,7	10,5
0,010	21,9	23,0	20,7	69,2	67,5	69,6	9,0	9,5	9,8
0,020	22,4	20,8	20,1	68,2	69,3	70,5	9,5	9,9	9,6
0,030	22,2	20,5	20,0	68,6	69,5	70,3	9,4	10,1	9,8

Tabla 18: Cribado de tensioactivos por congelación/descongelación: efecto de la concentración de PS80 sobre el material particulado por HIAC del SEQ ID NO: 32 tras el estrés de congelación y descongelación

PS80 (%)	Ciclos de congelación y descongelación; Partículas $\geq 2 \mu\text{m}$ por ml			Ciclos de congelación y descongelación; Partículas $\geq 5 \mu\text{m}$ por ml			Ciclos de congelación y descongelación; Partículas $\geq 10 \mu\text{m}$ por ml			Ciclos de congelación y descongelación; Partículas $\geq 25 \mu\text{m}$ por ml		
	0	3	5	0	3	5	0	3	5	0	3	5
0,000	60	81	88	15	19	14	4	6	2	1	1	1
0,020	27	65	82	6	9	12	1	2	6	0	1	1

Tabla 19: Cribado de tensioactivos por congelación/descongelación: efecto de la concentración de PS80 sobre el material particulado por MFI del SEQ ID NO: 32 tras el estrés de congelación y descongelación

PS80 (%)	Ciclos de congelación y descongelación; Partículas $\geq 2 \mu\text{m}$ por ml			Ciclos de congelación y descongelación; Partículas $\geq 5 \mu\text{m}$ por ml			Ciclos de congelación y descongelación; Partículas $\geq 10 \mu\text{m}$ por ml			Ciclos de congelación y descongelación; Partículas $\geq 25 \mu\text{m}$ por ml		
	0	3	5	0	3	5	0	3	5	0	3	5
0,000	134	230	343	37	46	104	5	7	28	0	3	5
0,010	33	74	113	5	14	7	0	0	0	0	0	0
0,020	56	147	115	14	26	30	7	0	5	5	0	3
0,030	44	145	129	21	35	44	5	12	12	0	3	0

[0206] No hubo diferencias significativas en la pureza de ninguna de las formulaciones probadas para el contenido de HMW, monómero o LMW por UP-SEC en comparación con la muestra de control. No hubo una tendencia discernible en los prototipos de formulación probados por CE-SDS o variantes de carga por iCIEF desialilado en comparación con el control. Se observó una ligera reducción en las partículas de $2 \mu\text{m}$ y $5 \mu\text{m}$ comenzando con al menos un 0,01 % de PS80 por estrés de congelación y descongelación en comparación con un 0 % de PS80.

[0207] Los resultados de este estudio demostraron que no se observan diferencias significativas entre las muestras que contienen 0,01 – 0,05 % de PS-80 después de la exposición a agitación o estrés por congelación/descongelación. Estos estudios no discriminaron entre las diversas concentraciones de PS80; sin embargo, se seleccionó un 0,02 % (peso/volumen) de PS80 para garantizar la calidad del producto y minimizar el riesgo de estabilidad mientras se mantiene la seguridad en apoyo de la cadena de suministro emergente.

Estudio de rango de concentración de sacarosa

[0208] Para garantizar que una solución inyectable de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 tuviera una tonicidad susceptible de administración parenteral (260 – 380 mOsm/kg), se preparó un rango de concentraciones de sacarosa descritas en la Tabla 20 en citrato

10 mM a pH 5,8 y se midió la osmolalidad. Sobre la base de estas preparaciones, se determinó que 8-10 % (peso/volumen) era apropiado para los estudios de optimización de formulaciones que se describen a continuación.

Tabla 20: Osmolalidad con sacarosa variable en la composición de la plataforma

Sacarosa (%) (peso/volumen)	Osmolalidad (mOsm/kg)
2	103
4	169
6	239
8	320
10	388
12	489
14	560

[0209] Se prepararon formulaciones que comprenden 50 mg/ml de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32, 8 % a 10 % (peso/volumen) sacarosa en citrato 10 mM a pH 5,8 con 0,02 % (peso/volumen) de PS80 e HP-SEC evaluó su pureza para controlar su estabilidad física en diferentes condiciones. Para el brazo de estabilidad térmica del estudio, las formulaciones se colocaron en estabilidad a 5 °C y 25 °C durante un máximo de 24 meses y 45 °C durante un máximo de 3 meses. Los datos de estabilidad mediante el análisis HP-SEC se proporcionan en la Tabla 21.

Tabla 21: Estudio de rango de concentración de sacarosa: Efecto de la concentración de sacarosa en el % de monómero por HP-SEC sobre la estabilidad

Sacarosa (%)	Punto en el tiempo (meses, m); Monómero (%)						
	Inicial	5 °C		25 °C		45 °C	
		12 millones	24 millones	6 millones	12 millones	1 millón	3M
8	99,4	99,3	99,1	99,1	98,1	98,2	92,3
9	99,4	99,3	99,0	98,7	98,1	98,3	92,4
10	99,4	99,3	99,1	98,6	98,1	98,4	92,5

[0210] Para el brazo de agitación del estudio, las formulaciones se llenaron en viales de vidrio tipo I de 3 ml y se agitaron a 250 RPM en un agitador de placas durante un máximo de 7 días. Los datos de agitación mediante el análisis HP-SEC se proporcionan en la Tabla 22.

Tabla 22: Estudio de rango de concentración de sacarosa: Efecto de la concentración de sacarosa en el % de monómero por HP-SEC en la agitación

Sacarosa (%)	Punto en el tiempo (días, D); Monómero (%)			
	Inicial	1D	3D	7D
8	98,6	98,7	98,6	98,8
9	98,5	98,7	98,7	98,7
10	98,6	98,6	98,7	98,8

[0211] Para el brazo de fotoestabilidad del estudio, se llenó otro conjunto de viales con 1 ml de cada formulación y se dividió en dos conjuntos para la incubación en una cámara de fotoestabilidad: uno expuesto a luz visible a 25 kLux durante 48 horas (1,2 mLuxhr) y otro expuesto a 20 W/m² de luz ultravioleta durante 10 horas (200 Wh/m²). También se prepararon dos viales de control para cada formulación: uno protegido de la luz por papel de aluminio en la cámara de fotoestabilidad y otro mantenido a 5 °C en un refrigerador. Los datos de fotoestabilidad mediante el análisis HP-SEC se proporcionan en la Tabla 23.

Tabla 23: Estudio de rango de concentración de sacarosa: Efecto de la concentración de sacarosa en el % de monómero por HP-SEC sobre la fotoestabilidad

Sacarosa (%)	Monómero (%)						
	Luz visible (1,2 mLuxhr)			Luz UV (200 Wh/m ²)			Control de 5 °C
	Control oscuro	Luz expuesta	Diferencia	Control oscuro	Luz expuesta	Diferencia	
8	99,4	83,8	-15,6	99,5	90,1	-9,4	99,4
9	99,5	82,7	-16,8	99,4	90,3	-9,1	99,4
10	99,4	83,3	-16,1	99,3	90,5	-8,8	99,4

[0212] No hubo diferencias significativas en los perfiles de estabilidad entre los diferentes niveles de sacarosa, ya que cada formulación tenía un 99 % de monómero después de 24 meses a 5 °C, un 98 % de monómero después de 24 meses a 25 °C y un 92 % de monómero después de 3 meses a 45 °C. No hubo una tendencia discernible en la pureza de ninguna de las formulaciones después de 7 días de agitación y todas las formulaciones retuvieron >98 % de monómero. Para el brazo de fotoestabilidad del estudio, cada formulación disminuyó en %monómero en aproximadamente un 16-17 % después de la exposición a la luz visible y aproximadamente un 9-10 % después de la exposición a la luz ultravioleta, lo que destaca una posible vía de degradación.

[0213] En conclusión, las concentraciones de sacarosa entre el 8 % y el 10 % (peso/volumen) no tuvieron un impacto significativo en el perfil de estabilidad a largo plazo de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32, cuando se protegió de la luz o bajo estrés físico debido a la agregación. También se observó que la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 es propensa a la inestabilidad de la luz, un mecanismo complejo de delinear. Por lo tanto, se desarrolló una formulación liofilizada que disminuye el potencial de inestabilidad química debido a la luz. Se consideró suficiente una concentración de sacarosa del 8 % (peso/volumen) para el desarrollo de formulaciones liofilizadas.

Estudio de rango de concentración de proteínas

[0214] Se realizó un estudio de estabilidad de rango de concentración de proteínas para evaluar el efecto del aumento de la concentración de proteínas en el perfil de estabilidad a largo plazo. En este estudio, la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 se formuló en concentraciones que variaron de 50 a 100 mg/ml en citrato 10 mM, sacarosa al 8 % (peso/volumen), 0,02 % (peso/volumen) PS80. Estas formulaciones se llenaron en viales de vidrio Tipo I y se colocaron en estabilidad durante 24 meses a 5 °C y 3 meses a 45 °C. La pureza de las formulaciones se midió mediante análisis HP-SEC en el transcurso del estudio para monitorear su estabilidad física y se resumió en la Tabla 24.

Tabla 24: Estudio de rango de concentración de proteínas de datos de la SEC

Concentración de proteínas (mg/ml)	Punto en el tiempo (meses, m); Monómero (%)						
	Inicial	5 °C			45 °C		
		6 M	12 M	24 M	1 M	2 M	3M
50	99,6	99,4	99,3	99,0	97,0	94,5	91,4
75	99,5	99,3	99,1	99,1	96,3	93,4	91,1
100	99,5	99,1	99,0	98,6	96,0	91,5	87,7

[0215] No hubo diferencias significativas en los perfiles de estabilidad de 5 °C entre las diferentes concentraciones de proteínas, donde todas las formulaciones tenían un monómero del 99 % después de 24 meses a 5 °C. Sin embargo, la concentración de 100 mg/ml mostró una degradación ligeramente mayor que las concentraciones más bajas con un 88 % de monómero después de 3 meses en condiciones de estrés (45 °C), mientras que las concentraciones más bajas retuvieron un 91 % de monómero.

[0216] Los resultados de este estudio demostraron que SEQ ID NO: 32 se puede concentrar hasta 75 mg/ml sin ningún impacto significativo en la estabilidad a largo plazo y estos primeros datos de estabilidad física sugirieron que una concentración tan alta como 100 mg/ml también puede tener suficiente estabilidad a largo plazo según los datos de 5 °C.

Composición de la formulación

[0217] Sobre la base del trabajo de desarrollo de formulaciones resumido anteriormente y el potencial de inestabilidad de carga durante el almacenamiento a largo plazo en las condiciones de almacenamiento recomendadas como una solución lista para usar, se desarrolló una formulación liofilizada con la composición optimizada. A continuación se describe la composición diana antes y después de la liofilización de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32.

Tabla 25: Formulación propuesta

Componente de formulación	Solución para la liofilización
Concentración de proteínas	50 mg/ml

Componente de formulación	Solución para la liofilización
Sistema de amortiguador y pH	Citrato de sodio 10 mM, pH 5,8
Agente estabilizante/de carga	8 % (peso/volumen) de sacarosa
Tensioactivo	0,02 % (peso/volumen) de polisorbato 80

[0218] La composición se proporcionó, además, en 2 concentraciones de viales, y cuando se reconstituyó con la cantidad definida de agua para inyección estéril (agua para inyección estéril), cada composición contiene 50 mg/ml de la trampa de ligando ActRIIa (ingrediente farmacéutico activo) y los siguientes excipientes: citrato 10 mM, sacarosa al 8 % (peso/volumen) y polisorbato 80 al 0,02 % (peso/volumen) a pH 5,8.

[0219] Los componentes presentes en la composición de la proteína de fusión liofilizada ActRIIa-hFc son los siguientes:

		Torta liofilizada (mg/vial)		Porcentaje en peso
<u>Componente</u>	<u>Función</u>	<u>45 mg/vial</u>	<u>60 mg/vial</u>	
Proteína de fusión de ActRIIa-hFc	Ingrediente activo	55	72,5	37,6 %
Ácido cítrico monohidrato	Amortiguador	0,48	0,64	0,32 %
Citrato trisódico dihidrato	Amortiguador	2,56	3,37	1,75 %
Polisorbato 80	Tensioactivo	0,22	0,29	0,15 %
Sacarosa	Ajuste de tonicidad	88	116	60,2 %
Total		146,26 mg	192,8 mg	

[0220] Para la administración, el liofilato en el vial de 45 mg se reconstituye con 1,0 ml de agua para inyección estéril (agua para inyección estéril), y el liofilato en el vial de 60 mg se reconstituye con 1,3 ml de agua para inyección estéril. Ambos dan como resultado una solución trampa de ligando ActRIIa de al menos 50 mg/ml.

Robustez del pH de la formulación liofilizada

[0221] Se realizaron estudios para evaluar la robustez de los componentes críticos en la formulación. Este estudio inicial se realizó para evaluar el efecto del pH en la estabilidad de las

formulaciones liofilizadas. Se prepararon formulaciones con pH de 5,3 a 6,3 en la formulación amortiguador de citrato 10 mM a pH 5,8 con sacarosa al 8 % (peso/volumen) y polisorbato 80 al 0,02 % (peso/volumen) a 50 mg/ml de proteína. Estas formulaciones (2 ml) se llenaron en viales de vidrio tipo I de 5 ml y se liofilizaron mediante un ciclo de liofilización de fase temprana y se colocaron en condiciones de estabilidad a 25 °C, 45 °C y 60 °C. La pureza de las formulaciones fue medida por HP-SEC en el transcurso del estudio para monitorear su estabilidad física y resumida en la Tabla 26.

Tabla 26: Datos de la SEC para la robustez del pH de la formulación del producto

pH	Punto en el tiempo (meses, m); Monómero (%)							
	Antes de Lyo	Inicial	25 °C			45 °C		
			3	6	9	1	3	6
5,3	99,6	99,6	99,4	99,3	99,3	98,9	98,8	98,1
5,6	99,6	99,6	99,5	99,3	99,2	98,5	99,0	98,1
5,8	99,6	99,6	99,5	99,3	99,3	98,9	99,0	98,2
6,0	99,6	99,6	99,6	99,5	99,3	99,2	99,0	98,4
6,3	99,6	99,5	99,5	99,2	99,3	99,1	99,0	98,3

[0222] No hubo un efecto significativo del pH en el perfil de estabilidad del SEQ ID NO: 32 para temperaturas de 25 °C o 45 °C.

[0223] Los resultados de este estudio no demostraron ningún efecto significativo sobre la estabilidad biofísica de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 dentro de un rango de pH de 5,3 a 6,3 de las composiciones de la formulación en condiciones liofilizadas. Además, estudios de desarrollo anteriores mostraron que la variación en PS 80 no tuvo ningún impacto en la estabilidad biofísica en forma de solución. Por lo tanto, el pH y el PS80 se eliminaron como parámetros en los estudios de robustez de la formulación en condiciones liofilizadas.

Estudio de robustez de la formulación

[0224] Se realizó un estudio de robustez de la formulación para determinar la robustez de la formulación variando la concentración de proteína y sacarosa de sus niveles objetivo. Estos dos componentes fueron seleccionados para su evaluación, ya que demostraron tener el efecto más significativo en la determinación de la estabilidad de la proteína de fusión de ActRIIa-hFc del SEQ ID NO: 32 como producto liofilizado. Además, este estudio a escala de laboratorio aprovechó los parámetros del ciclo de liofilización y envasado primario para la fabricación.

[0225] Las formulaciones que variaron en concentración de proteína de 45 (Lo (bajo)) a 55 mg/ml (Hi) y concentración de sacarosa de 7 (Lo) a 9 % (Hi (alto)) (peso/volumen) se prepararon en amortiguador de citrato 10 mM con polisorbato 80 al 0,02 % (peso/volumen) como se

describe en la Tabla 27. 60 mg/vial, que contenían 1,45 ml de cada formulación, se llenaron en viales de vidrio 2R Tipo I y se liofilizaron utilizando el ciclo de liofilización comercial dirigido.

Tabla 27: Resumen de formulaciones para el estudio de robustez de formulaciones

Nivel	Concentración de proteínas (mg/ml)	Sacarosa (%)
Lo-Lo	45	7
Lo-Hi	45	9
Hi-Lo	55	7
Hi-Hi	55	9
Diana	50	8

[0226] Todos los prototipos de formulación, como tortas liofilizadas, se colocaron en condiciones de estabilidad de 5 °C, 25 °C y 40 °C durante un máximo de 18 meses, 6 meses y 3 meses, respectivamente. Los prototipos se analizaron para determinar la pureza por HP-SEC, la fragmentación por CE-SDS NR, las variantes de carga por iCIEF desialilada, las partículas por HIAC, el contenido de humedad por el pH de Karl-Fischer y el tiempo de reconstitución, y se resumieron en la Tabla 28 a la Tabla 38.

Tabla 28: Robustez de la formulación: tiempo de reconstitución

Nivel	Punto en el tiempo (meses, M): Tiempo de reconstitución (minutos: segundos)							
	Inicial	5 °C		25 °C			40 °C	
		6 M	18 M	1 M	3M	6 M	1 M	3M
Lo-Lo	2:09	1:44	2:07	1:46	1:58	1:54	1:29	2:01
Lo-Hi	2:25	1:48	2:14	2:03	2:21	1:53	1:41	2:00
Hi-Lo	2:23	1:54	2:09	2:13	2:28	2:09	1:58	2:29
Hi-Hi	2:40	1:46	2:23	2:05	2:32	2:09	2:03	2:37
Diana	1:53	1:38	2:16	1:44	1:53	1:43	2:06	2:12

Tabla 29: Robustez de la formulación: HMW por HP-SEC

Nivel	Punto en el tiempo (meses, m); HMW (%)									
	Inicial	5 °C				25 °C			40 °C	
		3M	6 M	12 M	18 M	1 M	3M	6 M	1 M	3M
Lo-Lo	0,5	0,6	0,6	0,6	0,7	0,6	0,7	0,8	0,9	1,2
Lo-Hi	0,5	0,5	0,6	0,5	0,7	0,6	0,6	0,7	0,7	0,9
Hi-Lo	0,6	0,6	0,7	0,7	0,8	0,7	0,8	0,9	1,1	1,6
Hi-Hi	0,5	0,6	0,6	0,5	0,7	0,6	0,6	0,7	0,8	1,1
Diana	0,5	0,5	0,6	0,5	0,7	0,6	0,6	0,7	0,8	1,0

Tabla 30: Robustez de la formulación: monómero de HP-SEC

Nivel	Punto en el tiempo (meses, m); Monómero (%)									
	Inicial	5 °C				25 °C			40 °C	
		3M	6 M	12 M	18 M	1 M	3M	6 M	1 M	3M
Lo-Lo	97,9	97,5	97,6	97,5	97,9	97,1	97,0	97,4	97,0	96,4
Lo-Hi	98,2	97,3	97,7	98,1	97,9	97,2	97,2	97,5	97,2	96,7
Hi-Lo	98,1	97,3	97,5	96,7	97,7	97,1	97,0	97,3	96,7	95,9
Hi-Hi	98,1	97,3	97,6	96,7	97,7	97,3	97,1	97,5	97,1	96,3
Diana	98,1	97,3	97,6	96,8	97,8	97,5	97,1	97,5	97,2	96,6

Tabla 31: Robustez de la formulación: LMW por HP-SEC

Nivel	Punto en el tiempo (meses, m); LMW (%)									
	Inicial	5 °C				25 °C			40 °C	
		3M	6 M	12 M	18 M	1 M	3M	6 M	1 M	3M
Lo-Lo	1,6	2,0	1,8	2,0	1,4	2,3	2,4	1,8	2,1	2,4
Lo-Hi	1,3	2,2	1,8	1,3	1,5	2,2	2,2	1,8	2,0	2,4
Hi-Lo	1,4	2,1	1,8	2,6	1,4	2,2	2,2	1,8	2,2	2,5
Hi-Hi	1,4	2,2	1,8	2,8	1,6	2,1	2,3	1,8	2,0	2,6
Diana	1,4	2,2	1,9	2,7	1,5	2,0	2,3	1,8	2,0	2,4

Tabla 32: Robustez de la formulación: pico menor y pico mayor por CE-SDS NR

Nivel	Punto en el tiempo (meses, m); Pico menor (%)					Punto en el tiempo (meses, m); Pico mayor (%)				
	Inicial	5 °C	25 °C	40 °C		Inicial	5 °C	25 °C	40 °C	
		18 M	3M	1 M	3M		18 M	3M	1 M	3M
Lo-Lo	1,5	1,4	1,0	1,9	1,6	98,5	98,6	99,0	98,1	98,4
Lo-Hi	2,0	1,3	1,8	2,1	1,2	98,0	98,8	98,2	97,9	98,8
Hi-Lo	1,9	1,3	1,9	1,6	2,3	98,1	98,8	98,1	98,4	97,7
Hi-Hi	2,1	1,2	1,5	2,1	2,3	97,9	98,8	98,5	97,9	97,7
Diana	2,1	1,2	1,9	1,9	2,6	97,9	98,7	98,1	98,1	97,4

Tabla 33: Robustez de la formulación: humedad por KF

Nivel	Punto en el tiempo (meses, m); Humedad (%) p/p							
	Inicial	5 °C				25 °C		40 °C
		3M	6 M	12 M	18 M	3M	6 M	3M
Lo-Lo	0,9	0,6	0,8	0,9	0,8	0,8	0,9	0,9
Lo-Hi	0,9	0,8	0,9	0,9	0,8	0,9	0,8	1,0
Hi-Lo	0,7	0,5	0,7	0,9	0,7	0,7	0,8	0,9
Hi-Hi	0,5	0,7	0,8	0,9	0,9	0,8	0,9	0,9
Diana	0,8	0,8	0,8	0,9	0,8	0,8	0,9	0,9

Tabla 34: Robustez de la formulación: especies ácidas por iCIEF desialilado

Nivel	Punto en el tiempo (meses, m); Especies ácidas (%)									
	Inicial	5 °C				25 °C			40 °C	
		3M	6 M	12 M	18 M	1 M	3M	6 M	1 M	3M
Lo-Lo	22,5	20,0	29,1	25,2	21,2	22,6	22,5	23,5	21,3	19,7
Lo-Hi	21,9	22,8	26,8	24,2	20,6	22,0	22,2	24,7	22,1	19,6
Hi-Lo	23,6	21,8	26,9	26,3	21,5	25,4	23,9	28,2	26,2	19,9
Hi-Hi	24,5	22,7	27,1	27,1	21,6	22,4	36,7	27,7	24,0	20,7
Diana	26,6	22,3	27,0	23,2	20,6	21,8	20,1	27,4	24,2	20,4

Tabla 35: Robustez de la formulación: Especies principales totales por iCIEF desialado

Nivel	Punto en el tiempo (meses, m); Total de especies principales (%)									
	Inicial	5 °C				25 °C			40 °C	
		3M	6 M	12 M	18 M	1 M	3M	6 M	1 M	3M
Lo-Lo	63,2	65,1	57,1	60,4	69,4	62,6	62,2	66,3	62,7	63,5
Lo-Hi	63,9	62,3	59,0	61,5	69,9	62,9	62,7	60,6	62,1	63,3
Hi-Lo	61,7	63,0	58,3	56,8	68,7	59,2	61,2	57,4	57,8	61,8
Hi-Hi	61,6	62,2	59,0	59,2	69,6	63,0	51,2	57,6	60,5	62,1
Diana	59,1	62,9	58,8	61,8	69,6	63,3	64,5	57,8	60,2	62,2

Tabla 36: Robustez de la formulación: especies básicas por iCIEF desialado

Nivel	Punto en el tiempo (meses, m); Especies básicas (%)									
	Inicial	5 °C				25 °C			40 °C	
		3M	6 M	12 M	18 M	1 M	3M	6 M	1 M	3M
Lo-Lo	14,3	15,0	13,8	14,5	9,4	14,8	15,3	10,2	16,0	17,9
Lo-Hi	14,3	14,9	14,2	14,3	9,5	15,2	15,1	14,8	15,8	17,1
Hi-Lo	14,7	15,3	14,7	16,9	9,7	15,4	15,0	14,4	16,0	18,3
Hi-Hi	13,9	15,1	14,0	13,7	8,8	14,6	12,0	14,7	15,5	17,2
Diana	14,3	14,9	14,3	15,0	9,8	14,8	15,4	14,7	15,6	17,5

Tabla 37: Robustez de la formulación: análisis de partículas de $\geq 2 \mu\text{m}$ y $\geq 5 \mu\text{m}$ por HIAC

Nivel	Punto en el tiempo (meses, m): $\geq 2 \mu\text{m}$ Partículas por ml										Punto en el tiempo (meses, m): $\geq$ partículas de $5 \mu\text{m}$ por ml							
	Inicial	5 °C			25 °C			40 °C		Inicial	5 °C			25 °C			40 °C	
		3M	6 M	12 M	1 M	3M	6 M	1 M	3M		3 M	6 M	12 M	1 M	3 M	6 M	1 M	3 M
Lo-Lo	2,260	3,365	360	5,305	2,373	855	428	980	773	415	430	100	1,162	1,738	160	138	155	240
Lo-Hi	1,013	773	1,573	3,675	2,000	925	1,610	1,533	665	143	75	660	888	1,335	153	438	710	123
Hi-Lo	1,205	2,073	513	3,095	1,448	913	915	1,818	1,408	350	775	38	883	610	233	230	420	425

Niv el	Punto en el tiempo (meses, m): ≥ 2 μm Partículas por ml									Punto en el tiempo (meses, m): ≥ partículas de 5 μm por ml									
	Inic ial	5 °C			25 °C			40 °C			Inic ial	5 °C			25 °C			40 °C	
		3M	6 M	12 M	1 M	3M	6 M	1 M	3M	3 M		6 M	12 M	1 M	3 M	6 M	1 M	3 M	
Hi- Hi	1,05 8	828	283	3,9 68	1,0 10	1,9 38	638	588	2,2 45	205	26 0	40	1,1 42	370	76 8	15 5	15 0	36 5	
Dia na	620	1,6 48	360	3,4 17	1,1 58	1,3 40	2,2 63	1,7 78	1,0 45	175	36 3	48	817	445	24 8	82 3	95 3	19 3	

Tabla 38: Robustez de la formulación: partículas de $\geq 10 \mu\text{m}$ y $\geq 25 \mu\text{m}$

Nivel	Punto en el tiempo (meses, m); ≥ 10 μm Partículas por ml									Punto en el tiempo (meses, m); ≥ 25 μm Partículas por ml									
	Inicia l	5 °C			25 °C			40 °C			Inicia l	5 °C			25 °C			40 °C	
		3 M	6 M	12 M	1 M	3 M	6 M	1 M	3 M	3 M		6 M	12 M	1 M	3 M	6 M	1 M	3 M	
Lo-Lo	143	58	15	445	863	63	80	45	55	30	13	0	32	20	3	8	18	3	
Lo-Hi	28	10	80	345	533	20	90	113	13	3	0	3	32	10	0	3	5	3	
Hi-Lo	65	245	3	353	168	43	50	105	98	3	0	0	25	0	0	3	5	5	
Hi-Hi	30	53	3	433	105	393	28	30	55	0	3	0	30	0	218	0	3	0	
Diana	58	80	5	190	88	58	43	393	40	3	5	3	12	5	10	5	8	0	

[0227] No hubo una tendencia discernible en el tiempo de reconstitución, el pH o el contenido de humedad de los prototipos seleccionados en este estudio en ninguna de las condiciones probadas. No hubo diferencias significativas en los perfiles de estabilidad de los prototipos de formulación para el contenido de HMW, monómero o LMW para temperaturas de almacenamiento de 5 °C y 25 °C y esto está alineado con el patrón de fragmentación observado por CE-SDS no reducido. Hubo una ligera diferenciación entre las formulaciones en almacenamiento a 45 °C con la formulación de alta concentración de proteína (55 mg/ml) y baja concentración de sacarosa (7 %), Hi-Lo, que tiene ligeramente más especies de HMW (~0,5 %) que las demás en promedio, como se muestra en la **Figura 12**.

[0228] No hubo diferencias significativas en los perfiles de estabilidad de cada formulación para el contenido de especies ácidas, especies principales o especies básicas en cada una de las temperaturas de almacenamiento. Hubo cierta variación esperada en las diversas especies de

carga, donde las especies ácidas variaron entre 20-30 %, las especies principales totales entre 55-70 % y las especies básicas entre 10-20 %.

[0229] No hubo tendencias discernibles en las partículas/ml monitoreadas por HIAC para ninguno de los prototipos de formulación en tamaños ≥ 10 y ≥ 25 μm y estaban dentro de los criterios de aceptación especificados por USP<787> en todas las condiciones, ya que el volumen de llenado nominal para los 60 mg/vial es de 1,45 ml. En conclusión, este estudio demuestra la naturaleza robusta de la composición de la formulación dentro de la variabilidad potencial de la composición, es decir, ± 5 mg/ml de la concentración de proteína objetivo de 50 mg/ml y dentro de ± 1 % de la concentración objetivo de sacarosa del 8 % (peso/volumen).

Secuencias

Tabla 1: Secuencias

SEQ ID NO: 9	MGAAAKLAFA VFLISCSSGA ILGRSETQEC LFFNANWEKD RTNQTGVEPC YGDKDKRRHC FATWKNISGS IEIVKQGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV YFCCCEGNMC NEKFSYFPEM EVTQPTSNPV TPKPPYYNIL LYSLVPLMLI AGIVICAFWV YRHHKMAYPP VLVPTQDPGP PPPSPLLGLK PLQLLEVkar GRFGCVWKAQ LLNEYVAVKI FPIQDKQSWQ NEYEVYSLPG MKHENILQFI GAEKRGTSVD VDLWLITAFH EKGSLSDFLK ANVVSWNELC HIAETMARGL AYLHEDIPGL KDGHKPAISH RDIKSKNVLL KNNLTACIAD FGLALKFEAG KSAGDTHGQV GTRRYMAPEV LEGAINFQRD AFLRIDMYAM GLVLWELASR CTAADGPVDE YMLPFEEEIG QHPSLEDMQE VVVHKKKRPV LRDYWQKHAG MAMLCETIEE CWDHDAEARL SAGCVGERIT QMQRLTNIIT TEDIVTVVTM VTNVDFPPKE SSL
SEQ ID NO: 10	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFAT WKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEG NMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPP
SEQ ID NO: 11	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFAT WKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEG NMCNEKFSYFPEM
SEQ ID NO: 12	ATGGGAGCTG CTGCAAAGTT GCGGTTTGCC GTCTTTCTTA TCTCCTGTTC TTCAGGTGCT ATACTTGGTA GATCAGAAAC TCAGGAGTGT CTTTTCTTTA ATGCTAATTG GGAAAAAGAC AGAACCAATC AAACCTGGTGT TGAACCGTGT TATGGTGACA AAGATAAACG GCGGCATTGT TTTGCTACCT GGAAGAATAT TTCTGGTTCC ATTGAAATAG TGAAACAAGG TTGTTGGCTG GATGATATCA ACTGCTATGA CAGGACTGAT TGTGTAGAAA AAAAAGACAG CCCTGAAGTA TATTTTTGTT GCTGTGAGGG CAATATGTGT AATGAAAAGT TTTCTTATTT TCCGGAGATG GAAGTCACAC AGCCCACTTC AAATCCAGTT ACACCTAAGC CACCCTATTA CAACATCCTG CTCTATTCCT TGGTGCCACT TATGTTAATT GCGGGGATTG TCATTTGTGC ATTTTGGGTG TACAGGCATC ACAAGATGGC CTACCCTCCT GTACTTGTTT CAACTCAAGA CCCAGGACCA CCCCCACCTT CTCCATTACT

	AGGTTTGAAA CCACTGCAGT TATTAGAAGT GAAAGCAAGG GGAAGATTTG GTTGTGTCTG GAAAGCCCAG TTGCTTAACG AATATGTGGC TGTCAAAATA TTTCCAATAC AGGACAAACA GTCATGGCAA AATGAATACG AAGTCTACAG TTTGCCTGGA ATGAAGCATG AGAACATATT ACAGTTCATT GGTGCAGAAA AACGAGGCAC CAGTGTTGAT GTGGATCTTT GGCTGATCAC AGCATTTCAT GAAAAGGGTT CACTATCAGA CTTTCTTAAG GCTAATGTGG TCTCTTGGA TGAAGTGTGT CATATTGCAG AAACCATGGC TAGAGGATTG GCATATTTAC ATGAGGATAT ACCTGGCCTA AAAGATGGCC ACAAACCTGC CATATCTCAC AGGGACATCA AAAGTAAAAA TGTGCTGTTG AAAAACAACC TGACAGCTTG CATTGCTGAC TTTGGGTTGG CCTTAAATTT TGAGGCTGGC AAGTCTGCAG GCGATACCCA TGGACAGGTT GGTACCCGGA GGTACATGGC TCCAGAGGTA TTAGAGGGTG CTATAAACTT CCAAAGGGAT GCATTTTTGA GGATAGATAT GTATGCCATG GGATTAGTCC TATGGGAAC GGCTTCTCGC TGTACTGCTG CAGATGGACC TGTAGATGAA TACATGTTGC CATTTGAGGA GGAAATTGGC CAGCATCCAT CTCTTGAAGA CATGCAGGAA GTTGTTGTGC ATAAAAAAAA GAGGCCTGTT TTAAGAGATT ATTGGCAGAA ACATGCTGGA ATGGCAATGC TCTGTGAAAC CATTGAAGAA TGTTGGGATC ACGACGCAGA AGCCAGGTTA TCAGCTGGAT GTGTAGGTGA AAGAATTACC CAGATGCAGA GACTAACAAA TATTATTACC ACAGAGGACA TTGTAACAGT GGTCACAATG GTGACAAATG TTGACTTTCC TCCCAAAGAA TCTAGTCTA
SEQ ID NO:13	ATACTTGGTA GATCAGAAAC TCAGGAGTGT CTTTCTTTA ATGCTAATTG GGAAAAAGAC AGAACCAATC AAAGTGGTGT TGAACCGTGT TATGGTGACA AAGATAAACG GCGGCATTGT TTTGCTACCT GGAAGAATAT TTCTGGTTCC ATTGAAATAG TGAAACAAGG TTGTTGGCTG GATGATATCA ACTGCTATGA CAGGACTGAT TGTGTAGAAA AAAAAGACAG CCCTGAAGTA TATTTTGTGTT GCTGTGAGGG CAATATGTGT AATGAAAAGT TTTCTTATTT TCCGGAGATG GAAGTCACAC AGCCCACTTC AAATCCAGTT ACACCTAAGC CACCC
SEQ ID NO: 32	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFAT WKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEG

	NMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 41	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFAT WKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEG NMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 19	GGG
SEQ ID NO: 20	GGGG
SEQ ID NO: 21	TGGGG
SEQ ID NO: 22	SGGGG
SEQ ID NO: 23	TGGG
SEQ ID NO: 24	SGGG
SEQ ID NO: 25	GGGGS
SEQ ID NO: 33	MKFLVNVALVFMVVYISYIYA
SEQ ID NO: 34	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP
SEQ ID NO: 35	MGAAAKLAFVFLISCSSGA
SEQ ID NO: 36	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWE KDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD DINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQ PTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 37	ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTG TGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCCCGGCGCCGCTATACTTGGT

	AGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTTTTTTTAATGCTAATTGGG AAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGTTAT GGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAG AATATTTCTGGTTCCATTGAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGC TGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAA AAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGAGGGCA ATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCGGAGATGGAAG TCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCA CCGGTGGTGGAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTG AACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAC CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA GTCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCT CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGAATTC
SEQ ID NO: 38	ILGRSETQE
SEQ ID NO: 62	ILGRSETQECIFYNANWERDRTNRTGVESCYGDKDKRRHCFAT WKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCIEKKDSPEVYFCCCEG NMCNERFSYFPEMEVTQPTSNPVT PKPP
SEQ ID NO: 65	ILGRSETQECIYYNANWEKDKTNRSGIEPCYGDKDKRRHCFAT WKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRNDIEKKDSPEVFFCCCEG NMCNERFFYFPEMEVTQPTSNPVT PKPP
SEQ ID NO: 66	ILGRSETQECIFYNANWERDRTNRTGVESCYGDKDKRRHCFAT WKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCIEKKDSPEVYFCCCEG NMCNERFSYFPEMEVTQPTSNPVT PKPP

SEQ ID NO: 67	ILGRSETQECIYYNANWEKDKTNRSGIEPCYGDKDKRRHCFAT WKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRNDCIEKKDSPEVFFCCCEG NMCNERFFYFPEMEVTQPTSNPVTPKP
SEQ ID NO: 68	ILGRSETQECIFYNANWERDKTNRGTGVELCYGDKDKRRHCFAT WKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCIEKKDSPEVYFCCCEG NMCNERFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKP

[0230] Los métodos y materiales preferidos se describen en este documento, aunque también se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o prueba de los métodos y formulaciones actualmente divulgados. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en este documento se incorporan por referencia en su totalidad.

REIVINDICAMOS

1. Una formulación farmacéutica que comprende una proteína de fusión de ActRIIa humana, un amortiguador, un tensioactivo y un estabilizante, en donde la proteína de fusión de ActRIIa comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 41.
2. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, en donde el amortiguador se selecciona del grupo que consiste en citrato de sodio, succinato e histidina.
3. La formulación farmacéutica de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el amortiguador está presente en una cantidad de entre 4 mM y 50 mM.
4. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, en donde el amortiguador está presente en una cantidad de aproximadamente 10 mM.
5. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, en donde el amortiguador es un amortiguador de citrato a un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente pH 6,5.
6. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, en donde el amortiguador es un amortiguador de succinato a un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente pH 6,5.
7. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, en donde el amortiguador es un amortiguador de histidina a un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente pH 6,0.
8. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, en donde el amortiguador es un amortiguador de citrato a un pH 5,8.
9. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, en donde el amortiguador es un amortiguador de succinato a un pH de 5,8.
10. La formulación farmacéutica de las reivindicaciones 5 u 8, en donde el amortiguador de citrato comprende ácido cítrico monohidrato y citrato trisódico dihidratado.

11. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el tensioactivo es polisorbato 80 o polisorbato 20.
12. La formulación farmacéutica de la reivindicación 11, en donde el tensioactivo está presente en una cantidad de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,05 peso/volumen.
13. La formulación farmacéutica de la reivindicación 11, en donde el tensioactivo está presente en una cantidad de aproximadamente 0,02 % peso/volumen.
14. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el estabilizante es sacarosa.
15. La formulación farmacéutica de la reivindicación 14, en donde la sacarosa está presente en una cantidad de aproximadamente 8 % a aproximadamente 10 % en peso/volumen.
16. La formulación farmacéutica de la reivindicación 14, en donde la sacarosa está presente en una cantidad de aproximadamente el 8 % en peso/volumen.
17. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde la proteína de fusión humana ActRIIa está presente en una cantidad de aproximadamente 75 mg/ml o menos.
18. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde la proteína de fusión humana ActRIIa está presente en una cantidad de aproximadamente 50 mg/ml.
19. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en donde la formulación farmacéutica no contiene sal.
20. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde la proteína de fusión de ActRIIa es sotatercept.
21. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde la proteína de fusión de ActRIIa comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32.

22. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde la proteína de fusión de ActRIIa comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 41.
23. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde la formulación comprende una primera proteína de fusión de ActRIIa que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32 y una segunda proteína de fusión de ActRIIa que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 41.
24. Una formulación farmacéutica liofilizada hecha liofilizando la formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23.
25. La formulación farmacéutica liofilizada de la reivindicación 24, en donde la proteína de fusión de ActRIIa humana se proporciona en una cantidad de 45 mg/vial o 60 mg/vial.
26. Una formulación farmacéutica reconstituida realizada mediante la reconstitución de la formulación farmacéutica liofilizada de la reivindicación 24.
27. La formulación farmacéutica reconstituida de la reivindicación 26, en donde la formulación farmacéutica liofilizada se reconstituye con agua para inyección estéril.
28. La formulación farmacéutica reconstituida de la reivindicación 26, en donde la formulación liofilizada se reconstituye con agua para inyección estéril a una concentración final de proteína de aproximadamente 45 mg/ml a 55 mg/ml.
29. La formulación farmacéutica reconstituida de la reivindicación 28, en donde la formulación liofilizada se reconstituye con agua para inyección estéril hasta una concentración final de proteína de aproximadamente 50 mg/ml.
30. La formulación farmacéutica reconstituida de la reivindicación 26, en donde la formulación liofilizada se reconstituye con aproximadamente 0,5 ml a 1,8 ml de agua para inyección estéril.

31. La formulación farmacéutica reconstituida de la reivindicación 26, en donde la formulación liofilizada se proporciona en una cantidad de 45 mg/vial, y en donde la formulación se reconstituye con entre 0,65 ml y 0,75 ml de agua para inyección estéril.
32. La formulación farmacéutica reconstituida de la reivindicación 26, en donde la formulación liofilizada se proporciona en una cantidad de 60 mg/vial, y en donde la formulación se reconstituye con entre 0,65 ml y 1,75 ml de agua para inyección estéril.
33. Una formulación farmacéutica liofilizada que comprende una proteína de fusión de ActRIIa humana, un amortiguador, un tensioactivo y un estabilizante, en donde el amortiguador se selecciona para que sea fisiológicamente compatible y para mantener un pH de 5,8 cuando se reconstituye con agua para inyección estéril y en donde la proteína de fusión de ActRIIa humana comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 41.
34. La formulación farmacéutica liofilizada de la reivindicación 33, en donde el amortiguador comprende citrato.
35. La formulación farmacéutica liofilizada de la reivindicación 33 o 34, en donde el estabilizante es sacarosa.
36. La formulación farmacéutica liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35, en donde el tensioactivo es polisorbato 20 o polisorbato 80.
37. La formulación farmacéutica liofilizada de la reivindicación 36, en donde el tensioactivo es polisorbato 80.
38. Una formulación farmacéutica liofilizada que comprende una proteína de fusión de ActRIIa humana, citrato, polisorbato 80 y sacarosa, en donde la proteína de fusión de ActRIIa comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 41.
39. Una formulación farmacéutica liofilizada que comprende 55,0 mg de una proteína de fusión de ActRIIa humana, 0,48 mg de ácido cítrico monohidratado, 2,56 mg de citrato trisódico dihidratado, 0,22 mg de polisorbato 80 y 88,0 mg de sacarosa; en donde la proteína de fusión de ActRIIa humana comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 41.

40. Una formulación farmacéutica liofilizada que comprende 72,5 mg de una proteína de fusión de ActRIIa humana, 0,64 mg de ácido cítrico monohidratado, 3,37 mg de citrato trisódico dihidratado, 0,29 mg de polisorbato 80 y 116,0 mg de sacarosa; en donde la proteína de fusión de ActRIIa humana comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 41.
41. Una formulación farmacéutica reconstituida que comprende 50 mg/ml de una proteína de fusión de ActRIIa humana, citrato 10 mM, 0,2 mg/ml de polisorbato 80 y 80 mg/ml de sacarosa a pH 5,8, en donde la proteína de fusión de ActRIIa humana comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 41.
42. La formulación farmacéutica cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, en donde la formulación farmacéutica se administra mediante inyección subcutánea.
43. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, en donde la formulación está contenida en un vial de vidrio o dispositivo de inyección.
44. Un método de tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar (HAP) en un paciente humano que lo necesita, que comprende la administración al paciente de una formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43.
45. Un método de tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar (HAP) en un paciente humano que lo necesita, que comprende la reconstitución de la formulación farmacéutica liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 24, 25 o 33 a 40 para crear una formulación reconstituida y administrar la formulación reconstituida al paciente.
46. Uso de la formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar (HAP) en un paciente que lo necesite.

RESUMEN

En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona formulaciones farmacéuticas liofilizadas que comprenden una proteína de fusión recombinante que comprende un dominio extracelular (ECD) de proteínas del receptor de activina tipo IIA humana (ActRIIa) o derivados de las mismas unidas a un dominio constante de una inmunoglobulina, como el dominio Fc de IgG1 humana y uno o más aditivos farmacéuticos y/o excipientes.

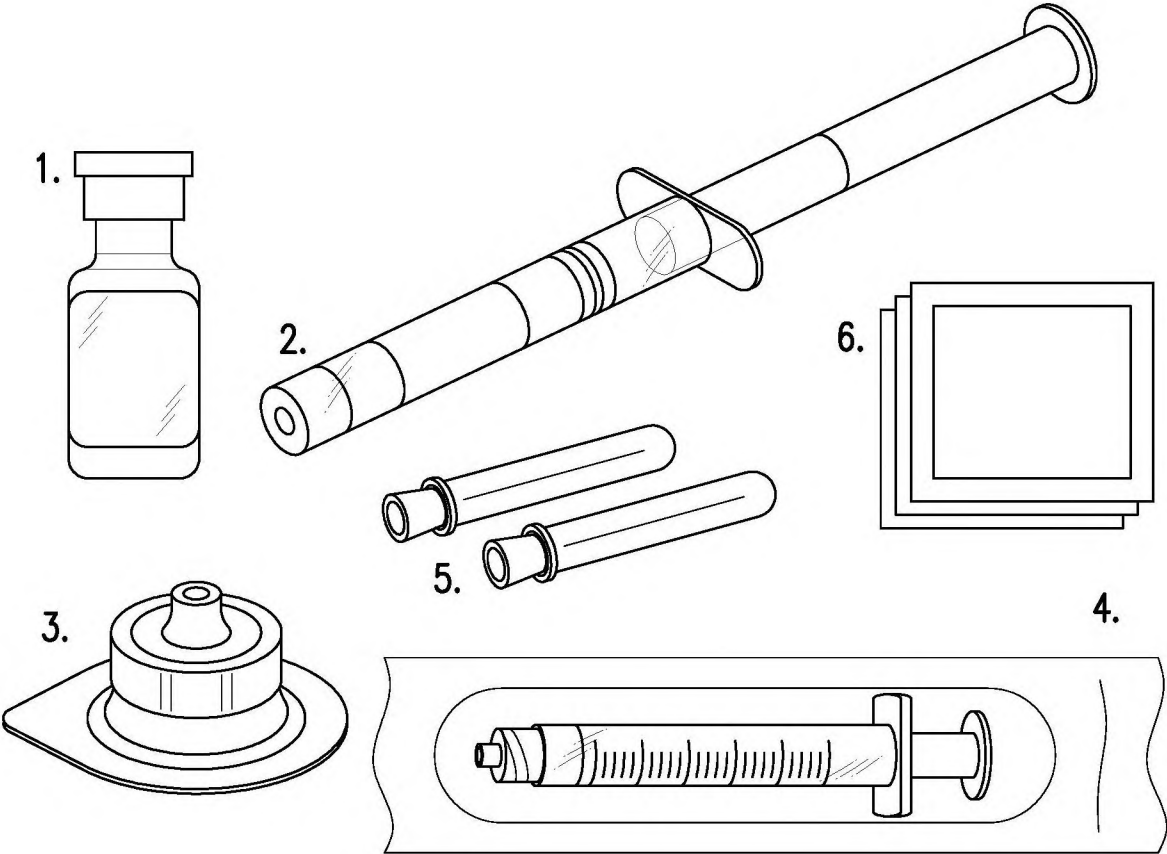


FIG. 1

	10	20	30	40	50
Humano	ILGRSETQEC	LIFFNANWEKD	RTNQGTGVEPC	YGDKDKRRHC	FATWKNISGS
Oveja	ILGRSETQEC	IFYNANWERD	RTNRTGVESC	YGDKDKRRHC	FATWKNISGS
Topo	ILGRSETQEC	LIFFNANWERD	RTNQGTGVEPC	YGDKDKHRHC	FATWKNISGS
Ratón	ILGRSETQEC	LIFFNANWERD	RTNQGTGVEPC	YGDKDKRRHC	FATWKNISGS
Pollo	ILGRSETQEC	IYYNANWEKD	KTNRSGIEPC	YGDKDKRRHC	FATWKNISGS
Vaca	ILGRSETQEC	IFYNANWERD	RTNRTGVESC	YGDKDKRRHC	FATWKNISGS
Búho	ILGRSETQEC	IYYNANWEKD	KTNRSGIEPC	YGDKDKRRHC	FATWKNISGS
Murciélag	ILGRSETQEC	IFYNANWERD	KTNRTGVELC	YGDKDKHRHC	FATWKNISGS
	60	70	80	90	100
Humano	IEIVKQGOWL	DDINCYDRTD	OVEKKDSPEV	YFCCCEGNMC	NEKFSYFP
Oveja	IEIVKQGOWL	DDINCYDRTD	CIEKKDSPEV	YFCCCEGNMC	NERFSYFP
Topo	IEIVKQGOWL	DDINCYDRTD	CIEKKDSPEV	YFCCCEGNMC	NEKFSYFP
Ratón	IEIVKQGOWL	DDINCYDXTD	CIEKKDSPEV	YFCCCEGNMC	NEKFSYFP
Pollo	IEIVKQGOWL	DDINCYDRND	CIEKKDSPEV	FFCCCEGNMC	NERFFYFP
Vaca	IEIVKQGOWL	DDINCYDRTD	CIEKKDSPEV	YFCCCEGNMC	NERFSYFP
Búho	IEIVKQGOWL	DDINCYDRND	CIEKKDSPEV	FFCCCEGNMC	NERFFYFP
Murciélag	IEIVKQGOWL	DDINCYDRTD	CIEKKDSPEV	YFCCCEGNMC	NERFSYFP
	110.....				
Humano	EVTQPTSNPV	TPKPP	SEQ ID NO: 10		
Oveja	EVTQPTSNPV	TPKPP	SEQ ID NO: 62		
Topo	EVTQPTSNPV	TPKAP	SEQ ID NO: 63		
Ratón	EVTQPTSNPV	TPKPP	SEQ ID NO: 64		
Pollo	EVTQPTSNPV	TPKPP	SEQ ID NO: 65		
Vaca	EVTQPTSNPV	TPKPP	SEQ ID NO: 66		
Búho	EVTQPTSNPV	TPKPP	SEQ ID NO: 67		
Murciélag	EVTQPTSNPV	TPKPP	SEQ ID NO: 68		

FIG.2

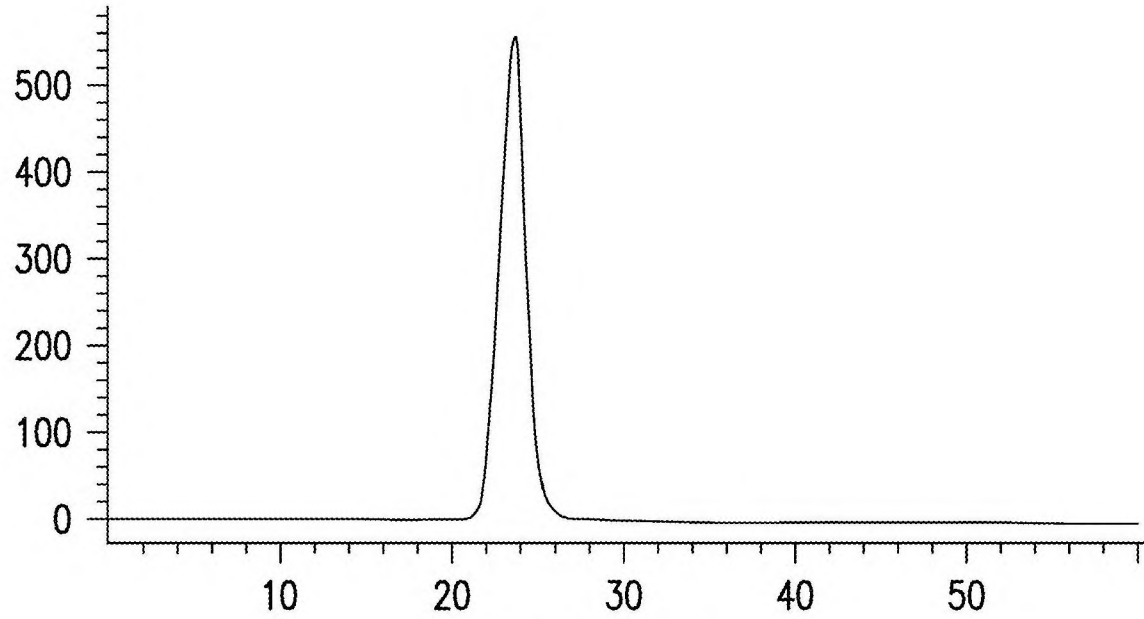


FIG.3A

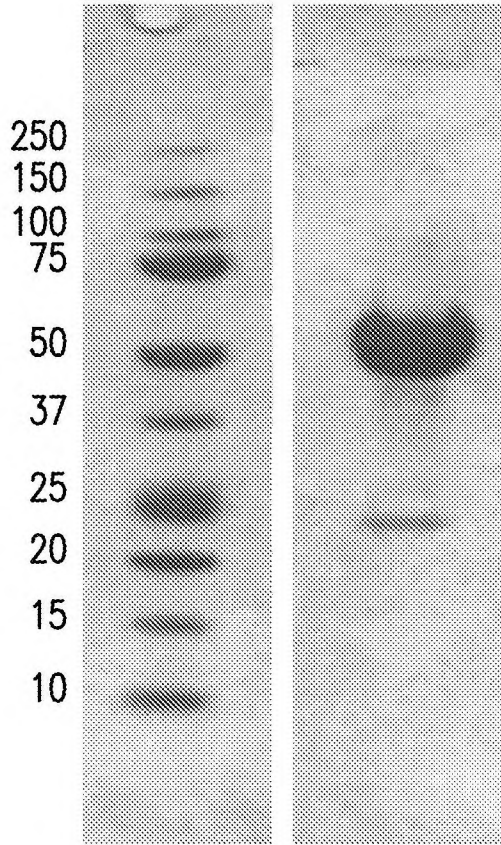


FIG.3B

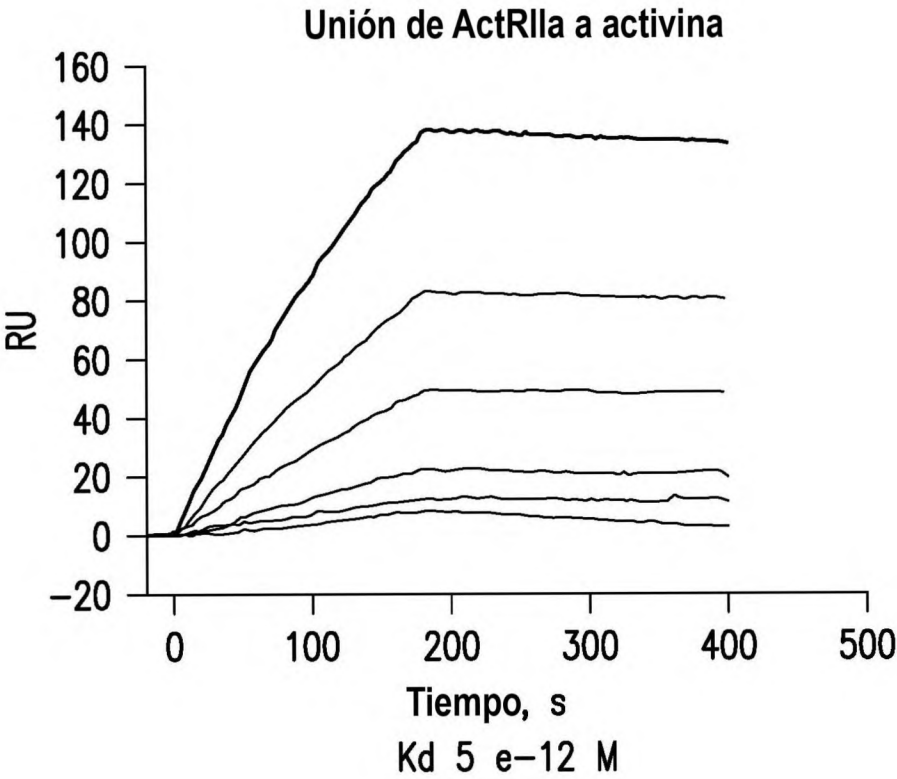


FIG.4A

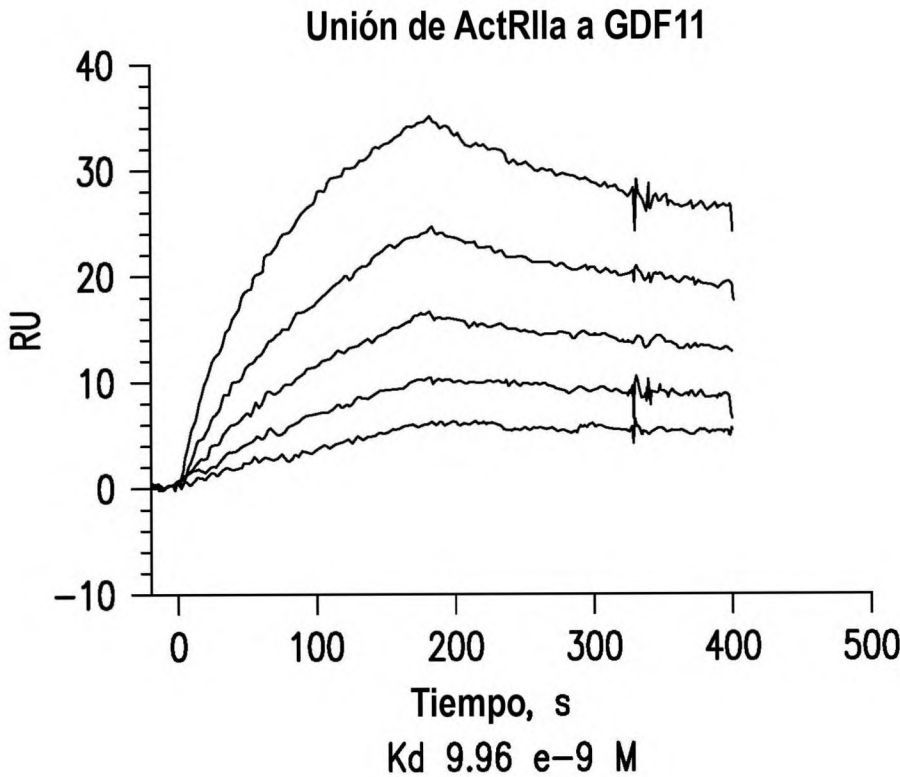


FIG.4B

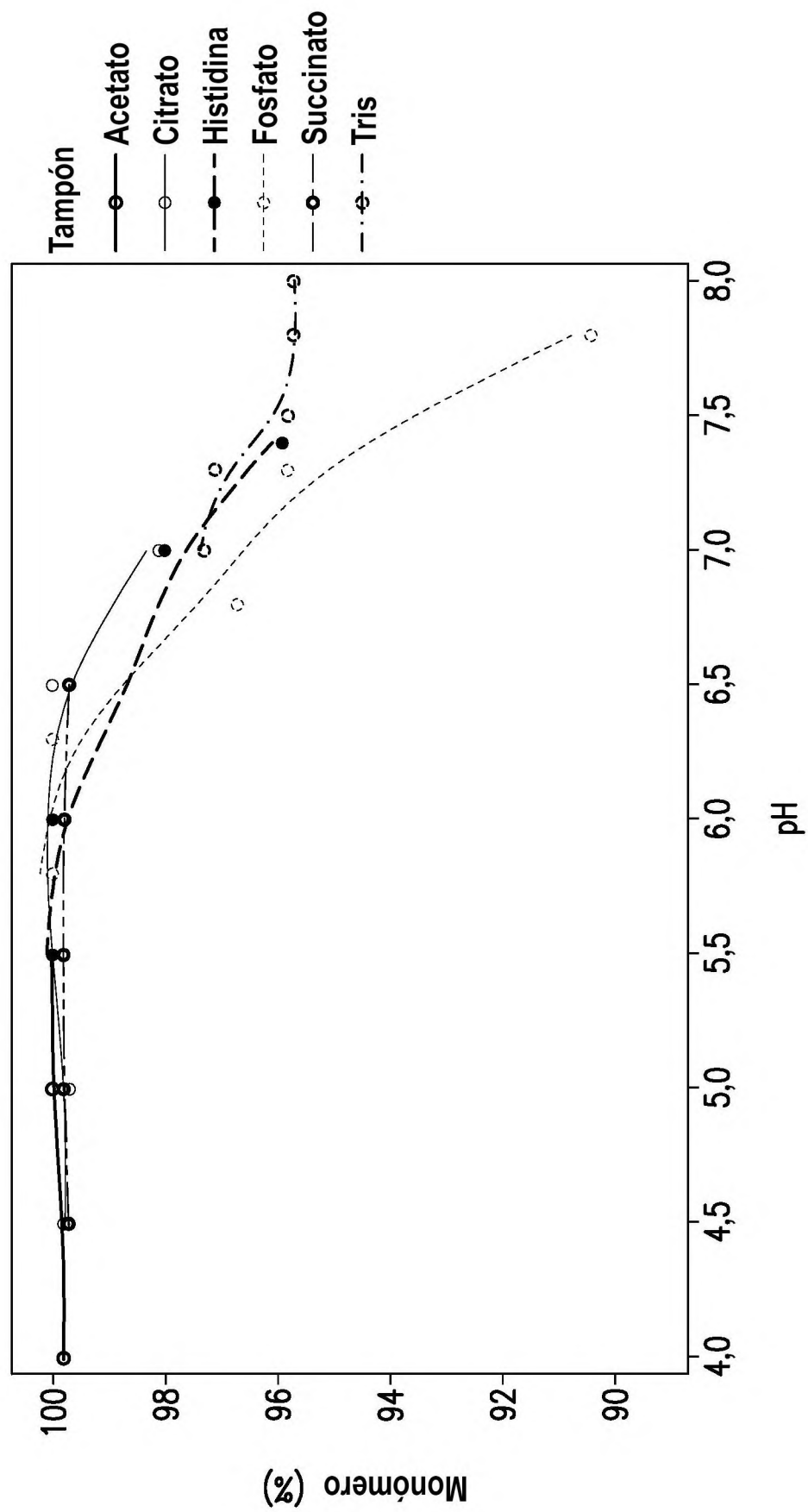


FIG.5

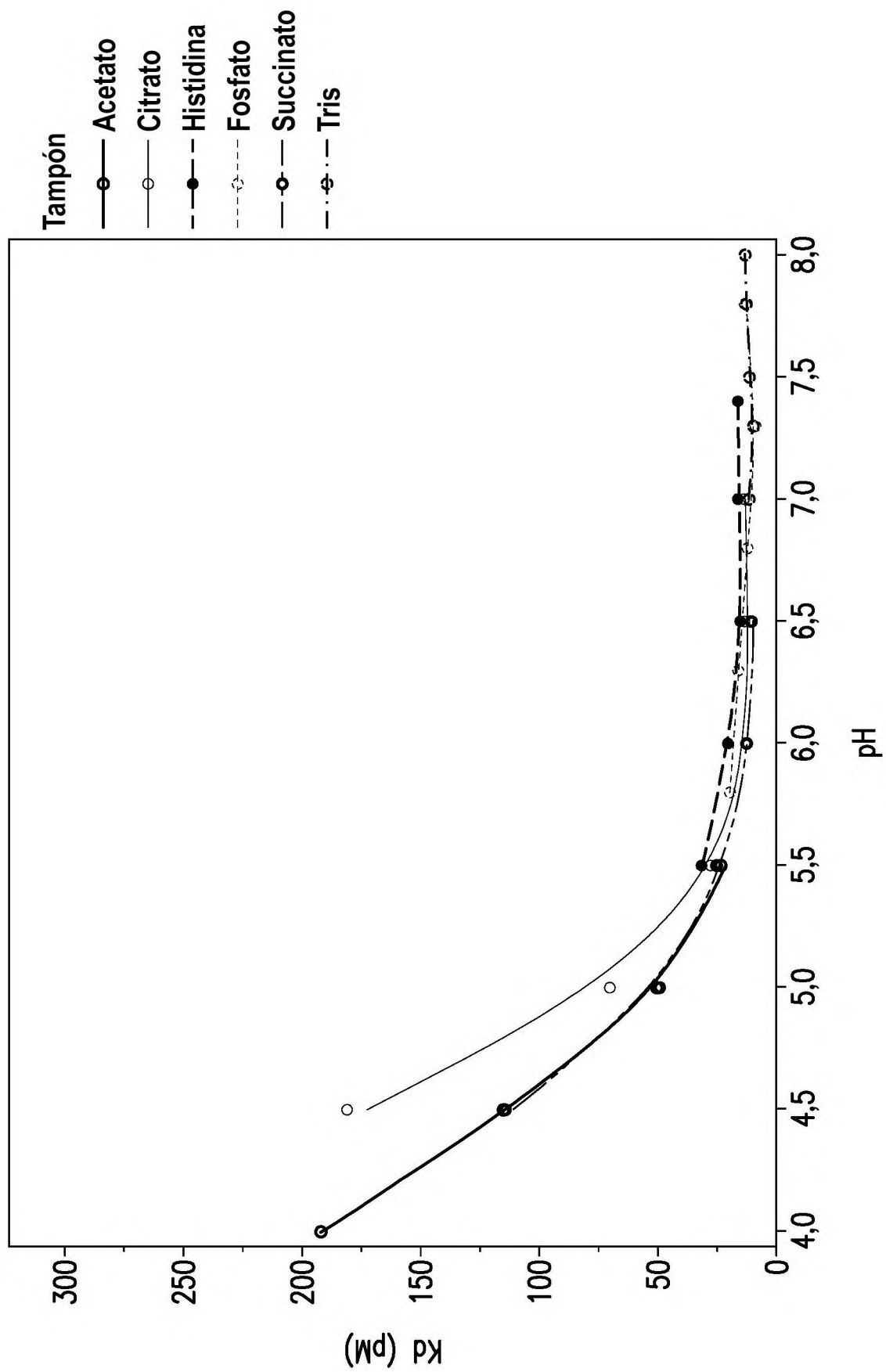


FIG.6

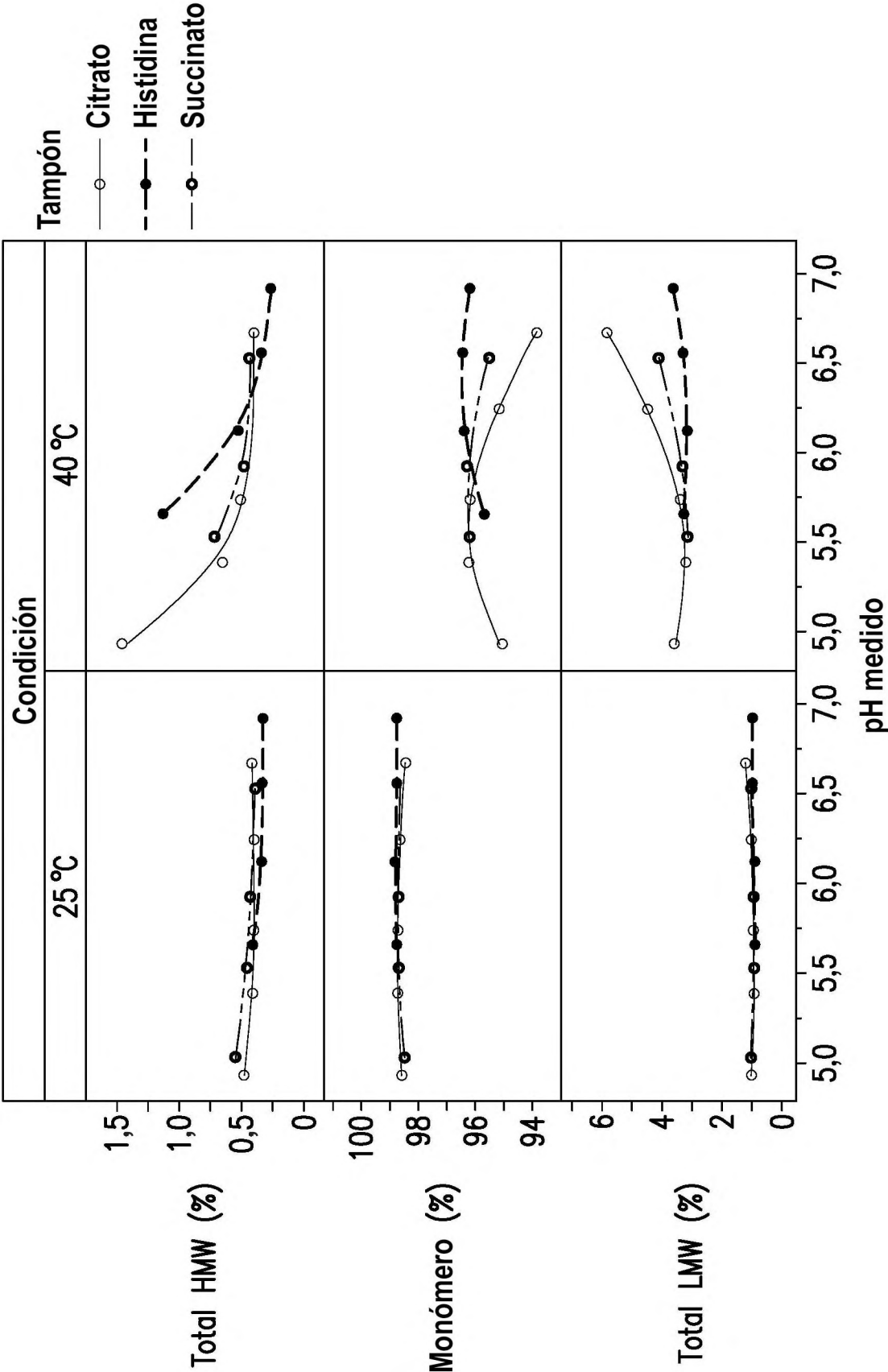


FIG.7

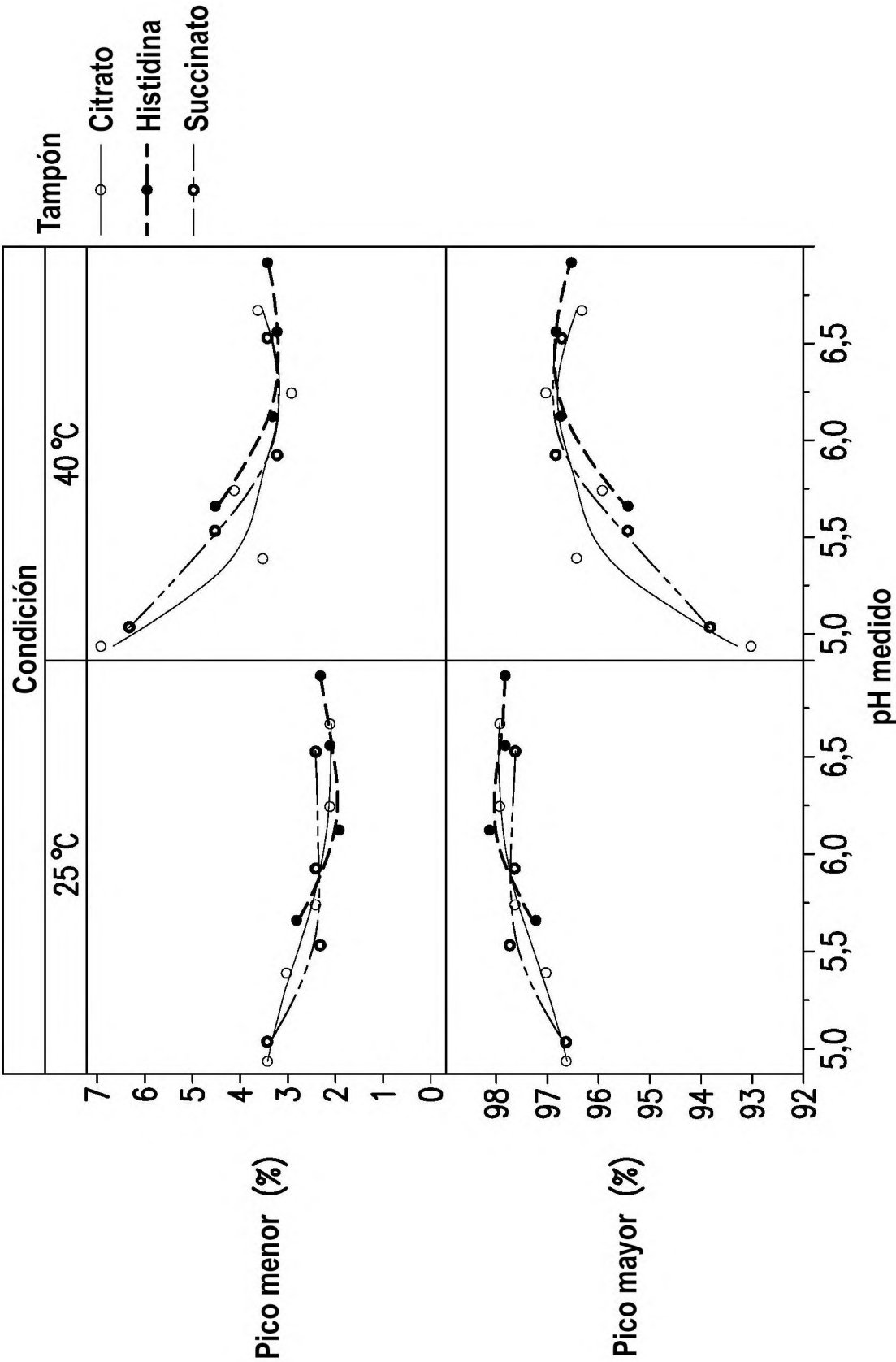


FIG.8

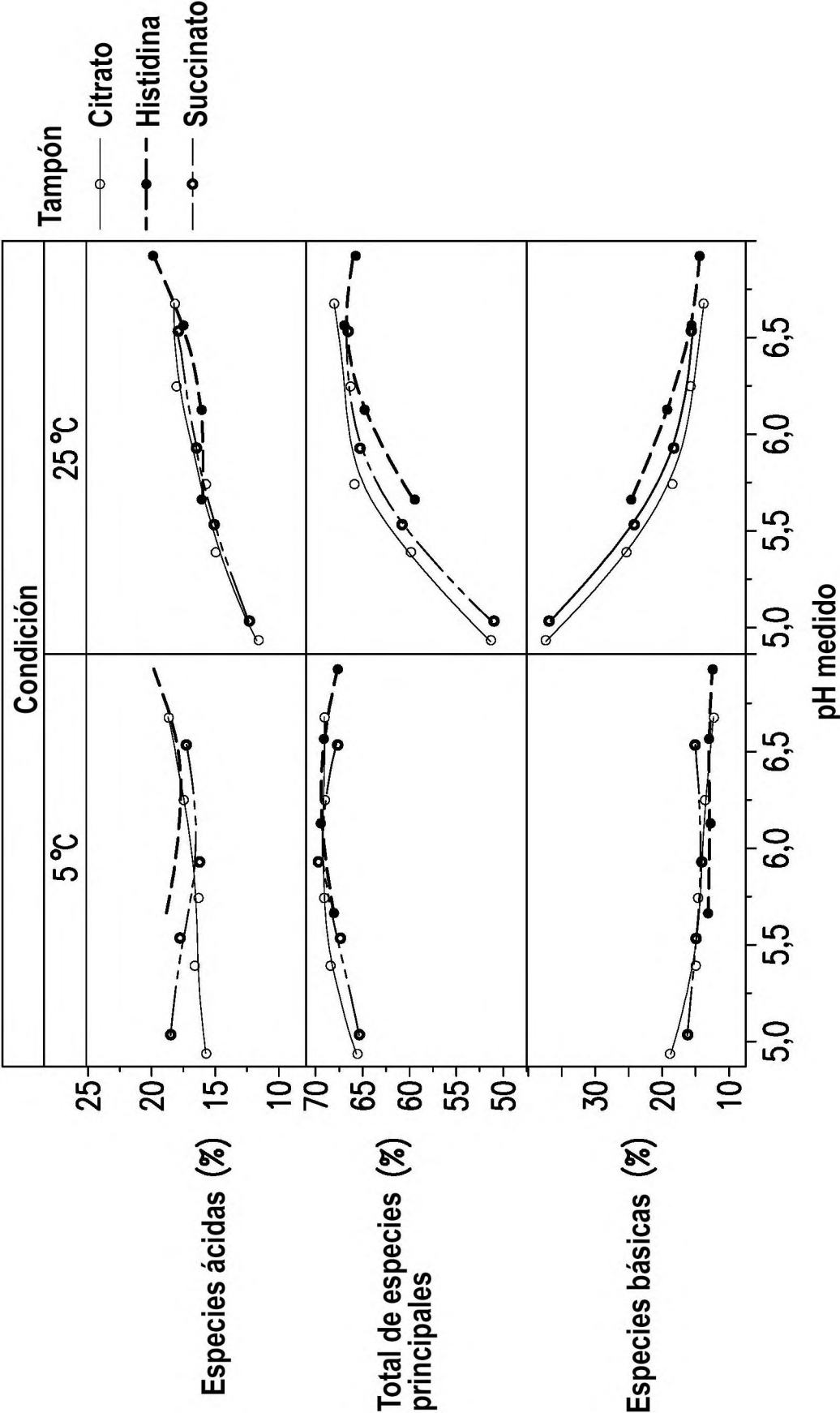


FIG.9

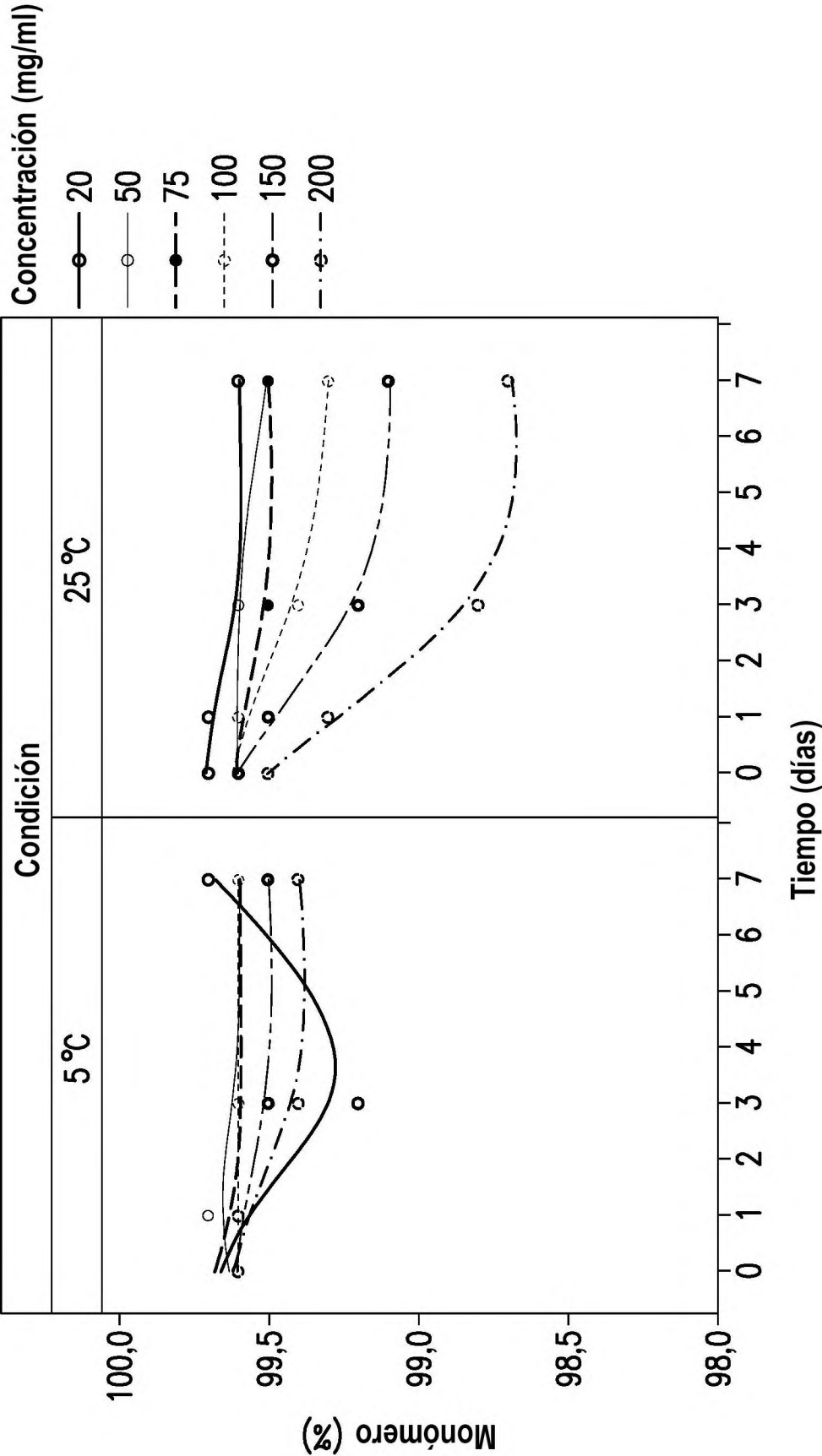


FIG.10

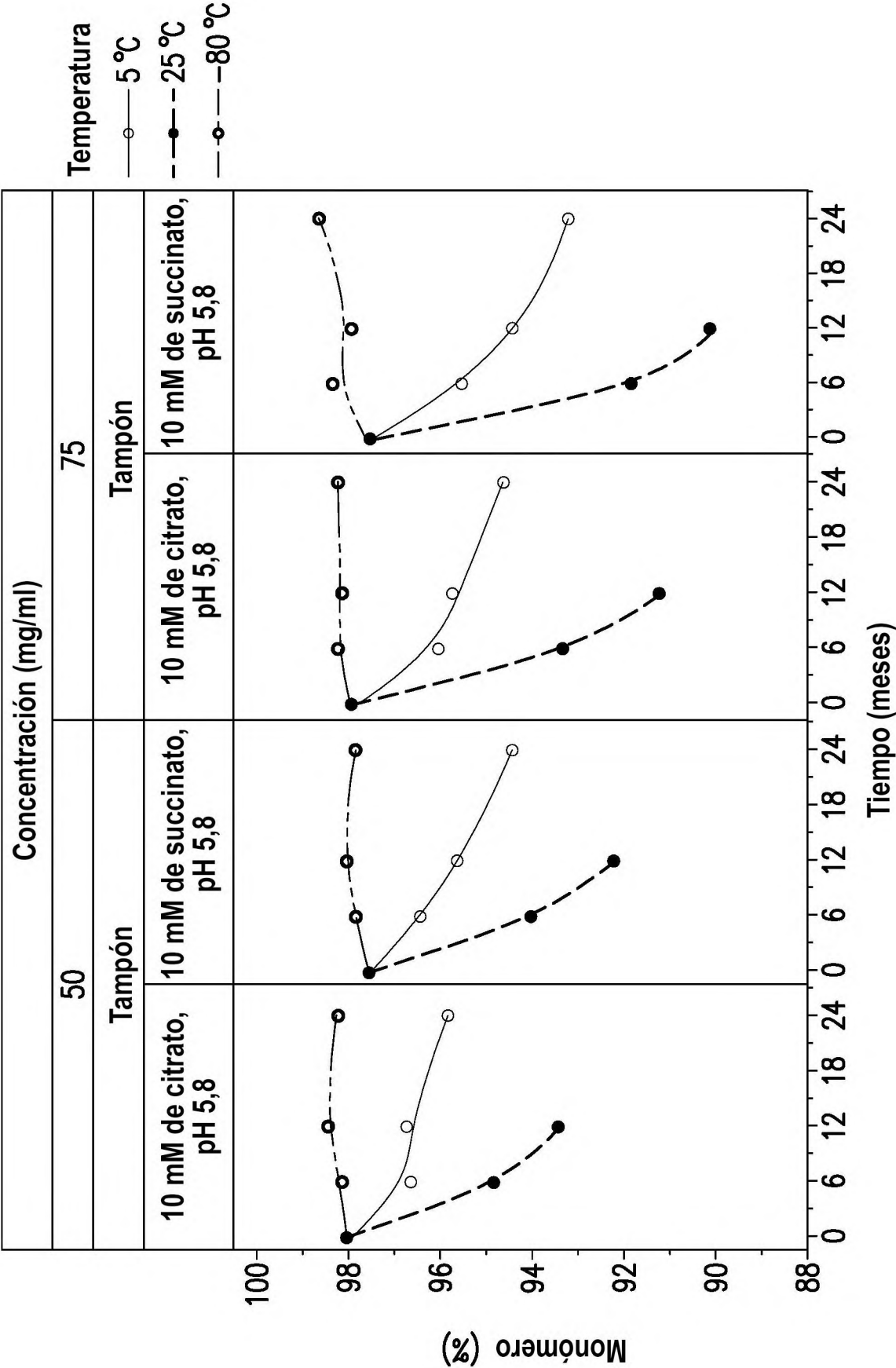


FIG.11

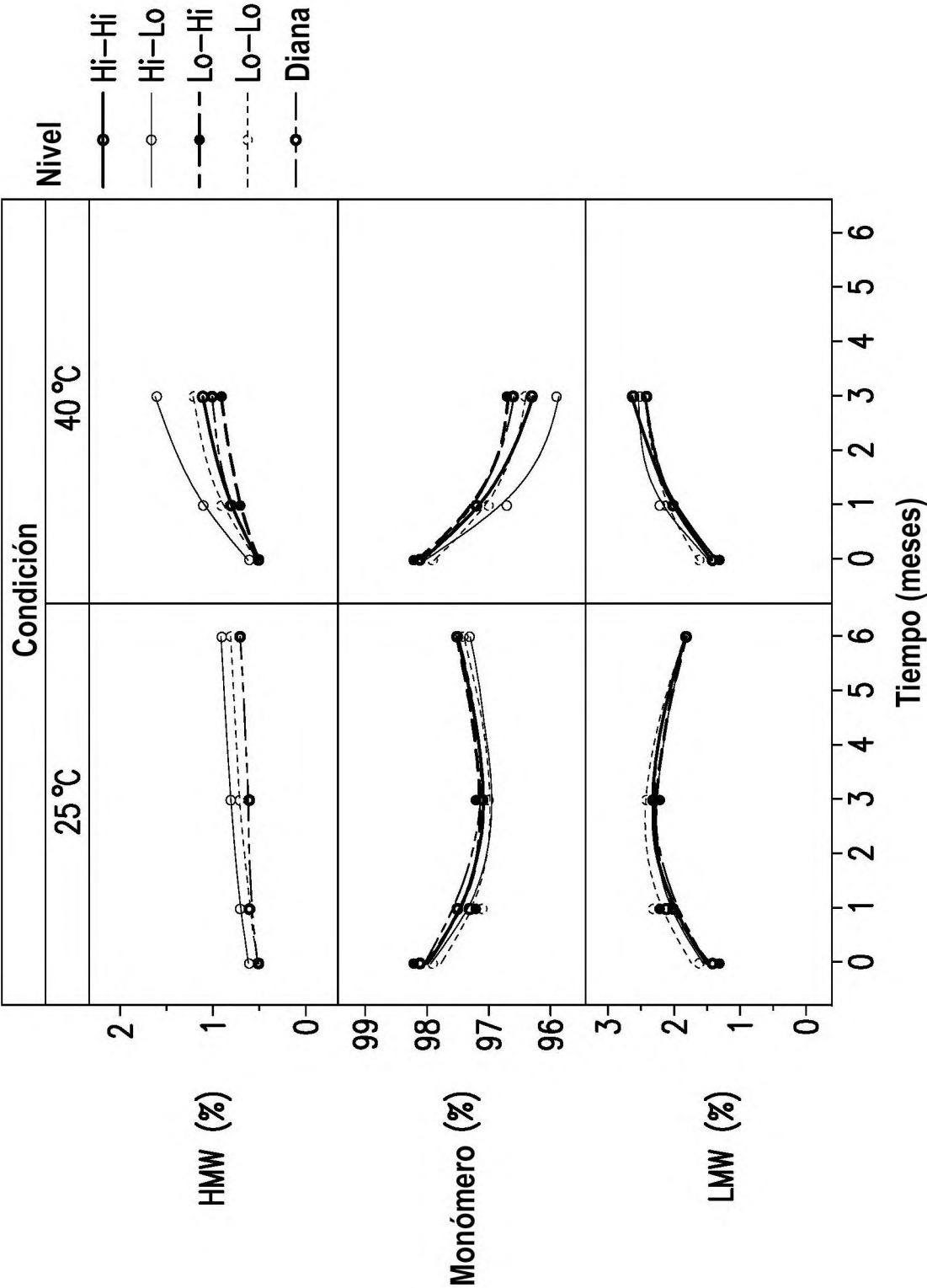


FIG.12