

FORMULACIONES QUE COMPRENDEN VARIANTES DE LA PROTEÍNA ACTRIIA

REFERENCIA CRUZADA A APLICACIONES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de EE. UU. nro. 63/451,195, presentada el 9 de marzo de 2023 y de la Solicitud Provisional de EE. UU. nro. 63/626,394, presentada el 29 de enero de 2024. Las aplicaciones anteriores se incorporan en el presente documento por referencia.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADA ELECTRÓNICAMENTE

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 6 de marzo de 2024, se denomina 1848179-0002-170-WO1_Sequence_Listing.xml, y tiene un tamaño de 51,2 KB.

CAMPO DE LA INVENCION

En el presente documento se describen formulaciones farmacéuticas líquidas estables que comprenden una proteína de fusión recombinante que comprende un dominio extracelular (ECD) de la proteína del receptor de activina tipo IIA humano (ActRIIA) o una variante de la misma unida a un dominio constante de una inmunoglobulina, como el dominio Fc de IgG1 humano y uno o más aditivos farmacéuticos y/o excipientes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La hipertensión pulmonar (PH) 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 PH 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 PH 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 PH 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.

La PH 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 PH 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 PH, existen cinco grupos principales de PH: (1) hipertensión arterial pulmonar (PAH), caracterizada por una presión de enclavamiento de PA ≤ 15 mm Hg; (2) PH debido a una enfermedad cardíaca izquierda (también conocida como hipertensión venosa pulmonar o insuficiencia cardíaca congestiva), (3) PH caracterizada por una presión de enclavamiento de PA > 15 mm Hg; (4) PH debido a enfermedades pulmonares y/o hipoxia; HP tromboembólica crónica; y (5) PH 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 PAH se clasifica además en PAH idiopática (IPAH), una enfermedad esporádica en la que no hay antecedentes familiares de PAH ni un factor de riesgo identificado; PAH hereditarios; PAH inducida por fármacos y toxinas; PAH asociada con enfermedades del tejido conectivo, infección por VIH, hipertensión portal, cardiopatías congénitas, esquistosomiasis y anemia hemolítica crónica; y PH persistente de los recién nacidos (Simonneau *et al.*, JACC 54(1):S44-54 (2009)). El diagnóstico de varios tipos de PH requiere una serie de pruebas.

En general, el tratamiento de la PH depende de la causa o clasificación de la PH. Cuando la PH es causada por un medicamento o una afección médica conocida, se conoce como PH 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, betabloqueantes e inhibidores ACE, o reparar o reemplazar una válvula mitral o una válvula aórtica. Las terapias para la PAH incluyen vasodilatadores pulmonares, digoxina, diuréticos, anticoagulantes y oxigenoterapia. Los vasodilatadores pulmonares se dirigen a diferentes vías, incluyendo la vía de la prostaciclina (p. ej., prostaciclina, incluyendo 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, incluyendo el sildenafil y el tadalafil) y la vía de la

endotelina-1 (p. ej., antagonistas de los receptores de endotelina, incluyendo el bosentán oral y el ambrisentán 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 PH y no tratan directamente la remodelación vascular subyacente y la muscularización de los vasos sanguíneos observadas en muchos pacientes con PH.

Por lo tanto, es un objeto de la presente divulgación proporcionar formulaciones farmacéuticas líquidas estables que comprenden una proteína de fusión ActRIIA y los métodos correspondientes para tratar, prevenir o reducir la tasa de progresión y / o la gravedad de la PH, 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 PH.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En el presente documento se proporcionan formulaciones farmacéuticas líquidas estables que comprenden una proteína de fusión recombinante que comprende un dominio extracelular (ECD) del receptor de activina tipo IIA humano (ActRIIA) o una variante del mismo unido a un dominio constante de una inmunoglobulina, como un dominio Fc de IgG1 humano, y uno o más aditivos farmacéuticos y/o excipientes.

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 de la 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 de la 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 de la 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 de la SEQ ID NO: 11.

En algunas modalidades, la proteína ActRIIA es una proteína de fusión ActRIIA que comprende un dominio extracelular 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 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 consiste en: 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 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 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32. En algunas modalidades, la proteína de fusión ActRIIA comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32. En algunas modalidades, la proteína de fusión ActRIIA consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32. En algunas modalidades, la proteína de fusión ActRIIA consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41. En algunas modalidades, la proteína de fusión ActRIIA consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32 o 41. En algunas modalidades, la proteína de fusión ActRIIA consiste en una variante de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 32, en donde la secuencia carece del residuo de lisina C-terminal de la SEQ ID NO: 32. En algunas modalidades, la variante de la proteína de fusión ActRIIA que carece del residuo de lisina C-terminal comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41. En algunas modalidades, la proteína de fusión ActRIIA es parte de un complejo de proteínas homodímeras. En algunas modalidades, la proteína de fusión ActRIIA está glicosilada. En algunas modalidades, la proteína de fusión ActRIIA tiene un patrón de glicosilación que se puede obtener por expresión en una célula de ovario de hámster chino.

En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento comprenden una proteína de fusión ActRIIA, o una variante, un tampón, un tensioactivo, un agente estabilizador y, opcionalmente, uno o más antioxidantes. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento comprenden una proteína de fusión ActRIIA de la SEQ ID NO: 32, o una variante de la SEQ ID NO: 32 que carece de la lisina C-terminal, un tampón, un tensioactivo, un agente estabilizador y, opcionalmente, uno o más antioxidantes.

En algunas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento comprenden de 10 a 100 mg/ml de 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 humano. En otras modalidades, las formulaciones farmacéuticas comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/ml de 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 humano. En otras modalidades, las formulaciones farmacéuticas comprenden de 40 a 50 mg/ml de 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 unidos a un dominio constante de una inmunoglobulina, como el dominio Fc de IgG1 humano. En otras modalidades, las formulaciones farmacéuticas comprenden 50 mg/ml de 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 unidos a un dominio constante de una inmunoglobulina, como el dominio Fc de IgG1 humano.

En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica proporcionada en el presente documento comprende de 10 a 100 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana de la SEQ ID NO: 32 o una variante de la SEQ ID NO: 32 que carece de la lisina C-terminal. En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica proporcionada en el presente documento comprende de 50 a 100 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana de la SEQ ID NO: 32 o una variante de la SEQ ID NO: 32 que carece de la lisina C-terminal. En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica proporcionada en el presente documento comprende de 40 a 50 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana de la SEQ ID NO: 32 o una variante de la SEQ ID NO: 32 que carece de la lisina C-terminal. En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica proporcionada en el presente documento comprende 100 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana de la SEQ ID NO: 32 o una variante de la SEQ ID NO: 32 que carece de la lisina C-terminal. En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica proporcionada en el presente documento comprende 50 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana de la SEQ ID NO: 32 o una variante de la SEQ ID NO: 32 que carece de la lisina C-terminal.

En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica proporcionada en el presente documento comprende de 10 a 100 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana de la SEQ ID NO: 32 y/o SEQ ID NO: 41. En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica proporcionada en el presente documento comprende de 50 a 100 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana de la SEQ ID NO: 32 y/o SEQ ID NO: 41. En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica proporcionada en el presente documento comprende de 40 a 50 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana de la SEQ ID NO: 32 y/o SEQ ID NO: 41. En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica proporcionada en el presente documento comprende 50 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana de la SEQ ID NO: 32 y/o SEQ ID NO: 41. En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica proporcionada en el presente documento comprende 100 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana de la SEQ ID NO: 32 y/o SEQ ID NO: 41.

En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica proporcionada en el presente documento comprende de 10 a 100 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana, un tampón, un tensioactivo, un agente estabilizador y, opcionalmente, uno o más antioxidantes, en donde el tampón no es histidina.

En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica proporcionada en el presente documento comprende de 10 a 100 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana de la SEQ ID NO: 32 y/o SEQ ID NO: 41, un tampón, un tensioactivo, un agente estabilizador y, opcionalmente, uno o más antioxidantes, en donde el tampón no es histidina.

En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica proporcionada en el presente documento comprende de 10 a 100 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana de la SEQ ID NO: 32, un tampón, un tensioactivo, un agente estabilizador y, opcionalmente, uno o más antioxidantes, en donde el tampón no es histidina.

En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento comprenden de 50 a 100 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana de la SEQ ID NO: 32, o una variante de la SEQ ID NO: 32 que carece de la lisina C-terminal, un tampón, un tensioactivo, un agente estabilizador y, opcionalmente, uno o más antioxidantes, en donde el tampón no es histidina.

En algunas modalidades, el agente tampón comprende ácidos orgánicos, succinato, fosfato, acetato, citrato, ácido cítrico, Tris, HEPES, glutamato, aminoácidos, MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), lactato o mezclas de aminoácidos. En algunas modalidades, el agente tampón comprende ácidos orgánicos, succinato, fosfato, acetato, citrato, ácido cítrico,

Tris, HEPES, glutamato, aminoácidos o mezclas de aminoácidos. En algunas modalidades, el agente tampón comprende citrato trisódico dihidratado. En algunas modalidades, el agente tampón comprende succinato, fosfato, acetato, citrato, lactato o glutamato. En algunas modalidades, el agente tampón comprende succinato, fosfato, acetato, citrato o glutamato. En algunas modalidades, el agente tampón comprende citrato trisódico dihidrato. En algunas modalidades, el agente tampón comprende ácido cítrico monohidrato. En algunas modalidades, el agente tampón comprende citrato. En algunas modalidades, el agente tampón comprende citrato trisódico dihidrato y ácido cítrico monohidrato. En ciertas modalidades, en donde la proteína tiene una carga negativa debido a la presencia de glicanos, el tampón no es histidina.

En algunas modalidades, el agente tampón se selecciona para que sea fisiológicamente compatible y para mantener un pH superior a 4. En algunas modalidades, el agente tampón se selecciona para que sea fisiológicamente compatible y para mantener un pH entre 5 y 7. En algunas modalidades, el agente tampón se selecciona para que sea fisiológicamente compatible y para mantener 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 tampón se selecciona para que sea fisiológicamente compatible y para mantener 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 tampón se selecciona para que sea fisiológicamente compatible y para mantener un pH de 5,8.

En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen un tampón, en donde el tampón es un tampón de fosfato para mantener el pH de la formulación farmacéutica entre 5 y 7. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en la presente memoria incluyen un tampón, en donde el tampón es un tampón de citrato para mantener el pH de la formulación farmacéutica entre 4,5 y 7. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen un tampón, en donde el tampón es un tampón de acetato para mantener el pH de la formulación farmacéutica entre 4,5 y 6. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en la presente memoria incluyen un tampón, en donde el tampón es un tampón succinato para mantener el pH de la formulación farmacéutica entre 4,5 y 5. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en la presente memoria

incluyen un tampón, en donde el tampón es un tampón de glutamato para mantener el pH de la formulación farmacéutica entre 5 y 7.

En algunas modalidades, el agente tampón está presente 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, el agente tampón está presente a una concentración de 10 a 50 mM. En algunas modalidades, el agente tampón está presente a una concentración de al menos 10 mM.

En algunas modalidades, el agente tampón es 10 mM de un tampón 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 tampón es 10 mM de un tampón 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 tampón es 10 mM de un tampón 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 tampón es 10 mM de un tampón citrato que mantiene un pH de la formulación farmacéutica a un pH de aproximadamente 5,8. En algunas modalidades, el agente tampón es 10 mM de un tampón succinato que mantiene un pH de la formulación farmacéutica a un pH de aproximadamente 5,8.

En algunas modalidades, el agente estabilizador se selecciona del grupo que consiste en: carboximetilcelulosa (CMC), dextrosa, polietilenglicol (PEG), albúmina, kleptose, prolina, sacarosa, trehalosa, manosa, maltosa, lactosa, glucosa, rafinosa, celobiosa, gentiobiosa, isomaltosa, arabinosa, glucosamina, fructosa, manitol, sorbitol, compuestos polihidroxi, polisacáridos, dextrano, almidón, almidón hidroxietílico, ciclodextrinas, N-metilpirrolidona, celulosa y ácido hialurónico. En algunas modalidades, el agente estabilizador 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, almidón hidroxietílico, ciclodextrinas, N-metilpirrolidona, celulosa y ácido hialurónico. En algunas modalidades, el agente estabilizador es sacarosa.

En algunas modalidades, el agente estabilizador está presente en la formulación a una concentración entre 2 y 16 % peso/volumen. En algunas modalidades, el agente estabilizador está presente en una concentración de 6 a 10 % peso/volumen. En algunas modalidades, el agente estabilizador está presente a una concentración de 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, 1,5 % 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, 19 % peso/volumen o 20 % peso/volumen. En algunas modalidades, el agente estabilizador está presente a una concentración de al menos el 8 % en peso/volumen.

En algunas modalidades, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en: lauril sulfato de sodio, dioctil sulfosuccinato de sodio y sulfonato de dioctilo de sodio, ácido quenodesoxicólico, sal sódica de N-lauroilsarcosina, dodecil sulfato de litio, sal sódica del ácido 1-octanosulfónico, colato de sodio hidratado, desoxicolato de sodio y sal sódica del ácido glicodesoxicólico, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio monohidrato, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, CHAPS, CHAPSO, SB3-10, SB3-12, digitonina, Triton X-100, Triton X-114, TWEEN-20, TWEEN-80, lauromacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado 10, 40, 50 y 60, monostearato de glicerol, Polisorbato-20, Polisorbato-40, Polisorbato-60, Polisorbato-65, Polisorbato-80, Poloxámero-188 y lecitina de soya. En ciertas modalidades, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en Poloxámero-188, dodecil sulfato de sodio (SDS), N-dodecil- β -D-maltósido (DDM), Polisorbato-20 y Triton X. En ciertas modalidades, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en Polisorbato-20, Polisorbato-80, Poloxámero-124, Poloxámero-127, Poloxámero-188 y Poloxámero-407.

En algunas modalidades, el tensioactivo es Polisorbato-80. En algunas modalidades, el tensioactivo es Polisorbato-20. En algunas modalidades, el tensioactivo es Poloxámero-188.

En algunas modalidades, el tensioactivo está presente en la formulación a una concentración de 0,02 a 2,0 mg/ml. En algunas modalidades, el tensioactivo está presente en la formulación a una concentración de 0,02 mg/ml, 0,03 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,06 mg/ml, 0,07 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,09 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,9 mg/ml, 1 mg/ml, 1,2 mg/ml, 1,3

mg/ml, 1,4 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1,6 mg/ml, 1,7 mg/ml, 1,8 mg/ml, 1,9 mg/ml y 2,0 mg/ml. En algunas modalidades, el tensioactivo está presente en la formulación a una concentración de 0,05 a 0,3 mg/ml. En algunas modalidades, el tensioactivo está presente a una concentración de al menos 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 mg/ml. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende una concentración de al menos 0,2 mg/ml de un tensioactivo. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende una concentración de al menos 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 o 0,5 mg/ml de un tensioactivo. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende una concentración de 0,05 a 0,5 mg/ml de un tensioactivo. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende una concentración de 0,1 a 0,5 mg/ml de un tensioactivo.

En algunas modalidades, uno o más de los aditivos farmacéuticos y/o excipientes es un antioxidante. En algunas modalidades de las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento, la concentración de antioxidantes es de 0,001 a 50 mM. En algunas modalidades de las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria, la concentración de antioxidantes es de 7,5 a 50 mM. En algunas modalidades de las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento, la concentración de antioxidantes es de 5 a 20 mM. En algunas modalidades de las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento, la concentración de antioxidantes es de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40 o 50 mM.

En una modalidad, la formulación farmacéutica comprende un antioxidante seleccionado del grupo que consiste en metionina (forma L o D), triptófano (forma L o D), dimercaprol y piridoxina. En una modalidad, la formulación farmacéutica comprende un antioxidante seleccionado del grupo que consiste en metionina (forma L o D), triptófano (forma L o D) y piridoxina. En ciertas modalidades, la formulación incluye L-metionina.

En ciertas modalidades, las formulaciones descritas en el presente documento incluyen de 1 a 50 mM de un antioxidante. En ciertas modalidades, las formulaciones descritas en el presente documento incluyen 5 mM, 10 mM o 50 mM de un antioxidante. En ciertas modalidades, la formulación incluye de 1 a 30 mM de un antioxidante. En ciertas modalidades, la formulación incluye de 1 a 20 mM de un antioxidante. En ciertas modalidades, la formulación incluye de 5 a 15 mM de un antioxidante. En ciertas modalidades, la formulación incluye de 5 a 10 mM de un antioxidante. En ciertas modalidades, la formulación incluye 10 mM, o al menos 10 mM de un antioxidante.

En ciertas modalidades, la formulación incluye de 1 a 50 mM de L-metionina. En ciertas modalidades, la formulación incluye de 1 a 30 mM de L-metionina. En ciertas modalidades, la formulación incluye de 1 a 20 mM de L-metionina. En ciertas modalidades, la formulación incluye de 5 a 15 mM de L-metionina. En ciertas modalidades, la formulación incluye de 5 a 10 mM de L-metionina. En ciertas modalidades, la formulación incluye 10 mM, o al menos 10 mM de L-metionina. En ciertas modalidades, las formulaciones descritas en el presente documento incluyen 5 mM, 10 mM o 50 mM de L-metionina.

En algunas modalidades de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento, la formulación farmacéutica incluye opcionalmente un agente quelante. En ciertas modalidades, el agente quelante es DTPA o EDTA. En ciertas modalidades, el agente quelante tiene una concentración de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 μ M. En una modalidad, la formulación líquida incluye de 1 a 100 μ M, de 1 a 30 μ M, de 1 a 20 μ M, 10 μ M -30 μ M de DTPA o EDTA. En ciertas modalidades, el agente quelante tiene una concentración de 7,5 a 100 μ M. En ciertas modalidades, el agente quelante tiene una concentración de 10 μ M.

En algunas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento comprenden de 10 a 100 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana de la SEQ ID NO: 32, de 10 a 50 mM de tampón citrato, de 2 a 16 % peso/volumen de sacarosa, de 0,05 a 0,5 mg/ml de Polisorbato-80, Polisorbato-20 o Poloxámero-188, de 0 a 50 mM de L-metionina y de 0 a 100 μ M o DTPA o EDTA. En otras modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento comprenden 50 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana de la SEQ ID NO: 32, 10 mM de tampón citrato, 8 % peso/volumen de sacarosa, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80 y 20 mM de L-metionina. En algunas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento comprenden de 10 a 100 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana de la SEQ ID NO: 32, o una variante de la SEQ ID NO: 32 que carece de lisina C-terminal, de 10 a 50 mM de tampón citrato, de 2 a 16 % peso/volumen de sacarosa, de 0,05 a 0,5 mg/ml de Polisorbato-80, Polisorbato-20 o Poloxámero-188, de 0 a 50 mM de L-metionina y de 0 a 100 μ M o DTPA o EDTA.

En otras modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento comprenden 50 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana de la SEQ ID NO: 32, o una variante de la SEQ ID NO: 32 que carece de lisina C-terminal, 10 mM de

tampón citrato, 8 % peso/volumen de sacarosa, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80 y 20 mM de L-metionina.

En algunas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria comprenden de 10 a 100 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana de la SEQ ID NO: 32 y/o SEQ ID NO: 41, de 10 a 50 mM de tampón citrato, de 2 a 16 % peso/volumen de sacarosa, de 0,05 a 0,5 mg/ml de Polisorbato-80, Polisorbato-20 o Poloxámero-188, de 0 a 50 mM de L-metionina y de 0 a 100 μ M o DTPA o EDTA. En otras modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria comprenden 50 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana de la SEQ ID NO: 32 y/o SEQ ID NO: 41, 10 mM de tampón citrato, 8 % peso/volumen de sacarosa, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80 y 20 mM de L-metionina.

En algunas modalidades, la proteína de fusión ActRIIA humana consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41. En algunas modalidades, la formulación liofilizada comprende una proteína de fusión ActRIIA humana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32 y una proteína de fusión ActRIIA humana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende sotatercept.

En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento contienen una mezcla de la SEQ ID NO: 32 y una variante de la SEQ ID NO: 32 que carece del residuo de lisina C-terminal (SEQ ID NO: 41). En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica descrita en el presente documento contiene una mezcla de la SEQ ID NO: 32 y una variante de la 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 de la SEQ ID NO: 32.

En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica descrita en el presente documento contiene una mezcla de la SEQ ID NO: 32 y una variante de la 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 de la SEQ ID NO: 32.

En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica descrita en el presente documento contiene una mezcla de la SEQ ID NO: 32 y una variante de la 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 de la SEQ ID NO: 41.

En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica descrita en el presente documento contiene una mezcla de la SEQ ID NO: 32 y una variante de la 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 de la SEQ ID NO: 41.

En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica descrita en el presente documento contiene el 100 % de la SEQ ID NO: 32 en peso. En ciertas modalidades, la

formulación farmacéutica descrita en el presente documento contiene el 100 % de la SEQ ID NO: 41 en peso.

Las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento se pueden utilizar para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar en un sujeto que lo necesite. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento son líquidas.

En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento son estables cuando se almacenan de 2 a 8 °C. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas líquidas se almacenan en condiciones refrigeradas (rango de temperatura: por lo general aproximadamente de 2 a 8 °C, pero bajo ciertas circunstancias, la formulación acuosa puede exhibir estabilidad a otras temperaturas, incluso a aproximadamente 25 °C y aproximadamente 40 °C para períodos de hasta aproximadamente 3, 6, 9 o 12 meses). En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica se administra a través de un autoinyector. En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica se administra mediante inyección subcutánea. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica se administra por vía parenteral.

En ciertas modalidades, las formulaciones descritas en el presente documento se encuentran en un dispositivo de inyección. En ciertas modalidades, las formulaciones descritas en el presente documento están contenidas en un dispositivo de inyección, en el que el dispositivo de inyección es un autoinyector. En otras modalidades, las formulaciones descritas en el presente documento están contenidas en un vial de vidrio.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** muestra una alineación de secuencia múltiple de varias proteínas ActRIIA de vertebrados y ActRIIA humanas (SEQ ID NO: 61 a 68).

Las **Figuras 2A y 2B** muestran la purificación de ActRIIA-hFc expresada en células CHO. La proteína se purifica como un pico único y bien definido, tal 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). Véase Ejemplo 1.

Las **Figuras 3A y 3B** muestran 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 $9,96 \times 10^{-9}$. Véase Ejemplo 1.

La **Figura 4** muestra los resultados del estudio de cribado de pH de estabilidad: efecto del pH y del tampón en $t = 0$. Véase Ejemplo 3: Estudios de viabilidad de pH y tampón.

La **Figura 5** muestra los resultados del estudio de cribado de estabilidad en función del pH: efecto del pH y del tampón a las 2 semanas a 40 °C. Véase Ejemplo 3: Estudios de viabilidad de pH y tampón.

La **Figura 6** muestra los resultados del estudio de cribado de estabilidad en función del pH: efecto del pH y del tampón a 1 mes a 40 °C. Véase Ejemplo 3: Estudios de viabilidad de pH y tampón.

La **Figura 7** muestra los resultados del estudio de cribado de estabilidad en función del pH: efecto del pH y del tampón a los 2 meses a 40 °C. Véase el Ejemplo 3: Estudios de viabilidad de pH y tampón.

La **Figura 8** muestra los datos de RMN 1H para la SEQ ID NO: 32 con y sin DTPA. Véase Ejemplo 3: Efecto del quelante de metales en la SEQ ID NO: 32.

La **Figura 9** muestra los datos de RMN de difusión para la SEQ ID NO: 32 con y sin DTPA. Véase Ejemplo 3: efecto del quelante de metales en la SEQ ID NO: 32.

La **Figura 10** muestra los resultados de los estudios de estabilidad coloidal para la SEQ ID NO: 32 y PS80 realizados por estrés por agitación. Véase Ejemplo 3: Estabilidad coloidal y cribado de tensioactivos.

La **Figura 11** muestra los resultados de los estudios de estabilidad coloidal para la SEQ ID NO: 32 y PS80 realizados por estrés por agitación. Véase Ejemplo 3: Estabilidad coloidal y cribado de tensioactivos.

La **Figura 12** muestra los resultados de los estudios de estabilidad coloidal para la SEQ ID NO: 32 y PS80 realizados por ciclos de congelación y descongelación. Véase Ejemplo 3: Estabilidad coloidal y cribado de tensioactivos.

La **Figura 13** muestra los resultados de los estudios de estabilidad coloidal para SEQ ID NO: 32 y PS80 realizados por ciclos de congelación y descongelación. Véase Ejemplo 3: Estabilidad coloidal y cribado de tensioactivos.

La **Figura 14** muestra la formulación de la SEQ ID NO: 32 con diferentes niveles (0 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM) de L-metionina que se expusieron a estrés lumínico en una cámara de fotoestabilidad en presencia de diferentes niveles de EDTA como agentes quelantes (0 µM, 7,5 µM, 15 µM, 30 µM, 60 µM). Véase Ejemplo 3: Estudio de rangos de quelante/L-metionina.

La **Figura 15** muestra la formulación de la SEQ ID NO: 32 con diferentes niveles (0 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM) de L-metionina que se expusieron a estrés lumínico en una cámara de fotoestabilidad en presencia de diferentes niveles de DTPA como agentes quelantes (0 µM,

7,5 μM , 15 μM , 30 μM , 60 μM). Véase Ejemplo 3: Estudio de rangos de quelante/L-metionina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

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

“Alrededor de” y “aproximadamente” significarán, en general, un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las mediciones que pueden realizarse, por ejemplo, a través de los procedimientos normales de medición, manipulación y muestreo involucrados en la preparación, caracterización y/o uso de la sustancia o composición; por error involuntario en estos procedimientos; a través de diferencias en la fabricación, fuente o pureza de los ingredientes empleados para hacer o usar las composiciones o llevar a cabo los procedimientos; y similares. Por lo general, los grados de error a modo de ejemplo están dentro del 10 % y, más preferiblemente, dentro del 5 % de un valor o rango de valores determinados. En ciertas modalidades, “aproximadamente” puede significar una variación de $\pm 0,1\%$, $0,5\%$, 1% , 2% , 3% , 4% , 5% o 10% .

Como alternativa, y particularmente en los sistemas biológicos, los términos “alrededor de” 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 el presente documento son aproximadas, a menos que se indique lo contrario, lo que significa que el término “alrededor de” o “aproximadamente” se puede inferir cuando no se indique expresamente.

Los términos “un” y “una” incluyen referentes plurales a menos que el contexto en el que se utiliza 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 el presente documento. Además, “y/o”, cuando se utilice en el presente documento, debe tomarse como una divulgación 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 utiliza en una frase como “A y/o B” en el presente documento tiene la intención de incluir “A y B”, “A o B”, “A” (sola) y “B” (sola). Del mismo modo, el término “y/o” tal como se utiliza 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 (sola); B (sola); y C (sola).

Los rangos numéricos que se describen en el presente documento incluyen los números que definen los rangos. Por ejemplo, cuando se recita un rango de valores de pH, como “un pH entre pH 5,5 y 6,0”, el rango está destinado a incluir los valores recitados. 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. Tal como se utiliza en el presente documento, una formulación que comprende “tampón citrato a pH X” se refiere a una solución a pH X y que comprende el tampón citrato, es decir, el pH está destinado a referirse al pH de la solución.

Una proteína descrita en el presente 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 salvaje), 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.

Una formulación “estable” es aquella en la que la proteína que contiene esencialmente conserva su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica tras almacenarse. Varias técnicas analíticas para medir la estabilidad de las proteínas están disponibles en la técnica y se revisan en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10:29-90 (1993). La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un período seleccionado.

Una formulación líquida “estable” es una formulación farmacéutica sin cambios significativos observados a una temperatura refrigerada (2 a 8 °C) durante al menos 3 meses, preferiblemente 6 meses, y más preferiblemente 1 año, e incluso más preferiblemente hasta 2 años. Además, una formulación líquida “estable” incluye una que exhibe las características

deseadas a temperaturas que incluyen 25 °C y 40 °C durante períodos que incluyen 1 mes, 3 meses, 6 meses, 12 meses y/o 24 meses. Los criterios normales aceptables de estabilidad son los siguientes. Normalmente, no más de aproximadamente 10 %, preferiblemente aproximadamente 5 % de la proteína se degrada según lo medido por SEC-HPLC. La formulación farmacéutica es incolora o transparente a ligeramente opalescente mediante análisis visual. La concentración, el pH y la osmolalidad de la formulación no tienen más de +/- 10 % de cambio. La potencia normalmente se encuentra entre 50 y 150 de la referencia. Normalmente, no más de aproximadamente 10 %, preferiblemente aproximadamente 5 % de la agregación está presente en la formulación. El término “tampón” abarca aquellos agentes que mantienen el pH de la solución de las formulaciones de la invención en un rango aceptable o, para las formulaciones liofilizadas de la invención, proporcionan un pH de solución aceptable antes de la liofilización. Los términos “liofilización”, “liofilizado” y “liofilizado” se refieren a un proceso mediante el cual el material para secar se congela primero y luego el hielo o el disolvente congelado se elimina por sublimación en un ambiente de vacío. Se puede incluir un excipiente en formulaciones preliofilizadas para mejorar la estabilidad del producto liofilizado tras el almacenamiento. El término “formulación farmacéutica” se refiere a las preparaciones que se presentan en una forma tal que permiten que los ingredientes activos sean eficaces y que no contienen componentes adicionales que sean tóxicos para los sujetos a los que se administraría la formulación. Los términos “formulación” y “formulación farmacéutica” se utilizan indistintamente en el presente documento. “Farmacéuticamente aceptable” se refiere a excipientes (vehículos, aditivos) y composiciones que pueden administrarse razonablemente a un sujeto para proporcionar una dosis efectiva del ingrediente activo empleado y que “generalmente se consideran seguros”, p. ej., que son fisiológicamente tolerables y no suelen producir una reacción alérgica o adversa similar, como malestar gástrico y similares, cuando se administra a un ser humano. En otra modalidad, este término se refiere a entidades moleculares y composiciones aprobadas por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal, o enumeradas en la Farmacopea de los EE. UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en humanos. Una formulación “reconstituida” es aquella que se ha preparado disolviendo una formulación de proteína liofilizada en un diluyente de modo que la proteína se disperse en la formulación reconstituida. La formulación reconstituida es adecuada para la administración, p. ej., la administración parenteral), y puede ser opcionalmente adecuada para la administración subcutánea.

Formulaciones farmacéuticas

En la presente descripción 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 humano. En determinados aspectos, la divulgación se refiere a formulaciones farmacéuticas líquidas estables que comprenden un dominio extracelular (ECD) de una proteína ActRIIA humana o derivados de la misma vinculados a un dominio constante de una inmunoglobulina, como el dominio Fc de IgG1 humano o la inyección.

Las formulaciones líquidas de esta invención minimizan la formación de agregados (especies de alto peso molecular) y partículas, mejoran la estabilidad coloidal, minimizan la fragmentación (especies de bajo peso molecular) y aseguran que la proteína mantenga su actividad biológica a lo largo del tiempo. En ciertas modalidades, la formulación se realiza tomando un ActRIIA que está, por ejemplo, en una formulación farmacéutica acuosa con tampón, e intercambiando el tampón hacia el tampón deseado como último paso del proceso de purificación. Posteriormente, el ActRIIA se concentra a la concentración deseada. No hay ningún paso de liofilización en esta modalidad. Además, se pueden agregar excipientes como estabilizadores y tensioactivos a la formulación de ActRIIA, que se diluye utilizando el tampón apropiado hasta la concentración final de proteínas. La formulación final se filtra y se llena en un recipiente final (p. ej., un autoinyector). Como alternativa, la formulación puede almacenarse en un vial y administrarse a través de un dispositivo o recipiente de inyección.

Las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento comprenden proteínas de fusión ActRIIA. En ciertas modalidades, la divulgación proporciona una formulación farmacéutica que comprende una proteína de fusión ActRIIA en donde la proteína está presente a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 8 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, aproximadamente 17,5 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 22,5 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 27,5 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 32,5 mg/ml, aproximadamente 35 mg/ml, aproximadamente 37,5 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 42,5 mg/ml, aproximadamente 45 mg/ml, aproximadamente 47,5 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 52,5 mg/ml, aproximadamente 55 mg/ml, aproximadamente 57,5 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 62,5 mg/ml, aproximadamente 65 mg/ml, aproximadamente 67,5 mg/ml,

aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 72,5 mg/ml, aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 77,5 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 82,5 mg/ml, aproximadamente 85 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 92,5 mg/ml, aproximadamente 95 mg/ml, aproximadamente 97,5 mg/ml o aproximadamente 100 mg/ml.

En ciertas modalidades, la proteína de fusión ActRIIA tiene una concentración 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 ActRIIA. En otras modalidades, la proteína de fusión ActRIIA tiene una concentración 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 ActRIIA. En algunas modalidades, la proteína de fusión ActRIIA tiene una concentración de aproximadamente 50 mg/ml.

En algunas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento comprenden de 10 a 100 mg/ml de 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 humano. En otras modalidades, las formulaciones farmacéuticas comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/ml de 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 humano. En otras modalidades, las formulaciones farmacéuticas comprenden 40-50 mg/ml de 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 unidos a un dominio constante de una inmunoglobulina, como el dominio Fc de IgG1 humano. En otras modalidades, las formulaciones farmacéuticas comprenden 50 mg/ml de 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 unidos a un dominio constante de una inmunoglobulina, como el dominio Fc de IgG1 humano.

En algunas modalidades, las formulaciones farmacéuticas líquidas de la proteína de fusión ActRIIA proporcionadas en el presente documento comprenden una proteína de fusión ActRIIA y uno o más aditivos farmacéuticos y/o excipientes. En ciertas modalidades, uno o más aditivos farmacéuticos y/o excipientes comprenden un tampón, un agente estabilizador,

un tensioactivo y, opcionalmente, uno o más antioxidantes que se describen con mayor detalle a continuación. Se pueden seleccionar agentes tampones para mantener el pH de la formulación durante el procesamiento. Los tensioactivos pueden seleccionarse en función de su capacidad para servir como emulsionante, humectante, solubilizante y/o dispersante.

Una persona experta en la materia reconocería que las concentraciones de los excipientes descritos en el presente 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 manufacturabilidad y/o la calidad del producto final, como la estabilidad y la administración de un producto farmacéutico (p. ej., proteína). Las formulaciones proporcionadas en el presente documento comprenden excipientes adecuados que mejoran la estabilidad y la seguridad.

Agentes tampón

Normalmente, se observa que la estabilidad de una formulación de proteína farmacológicamente activa es máxima en un rango de pH estrecho. 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 tampón casi siempre se emplean para controlar el pH en la formulación.

Se deben considerar varios factores al elegir un agente tampón. En primer lugar, la especie del tampón y su concentración deben definirse en función de su pKa y el pH de la formulación deseada. Igual de importante es asegurarse de que el tampón sea compatible con la proteína y otros excipientes de la formulación, y no catalice ninguna reacción de degradación. Un tercer aspecto importante para considerar es la sensación de escozor e irritación que el tampón 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 tiempo relativamente más prolongado que aquel 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 tampón (y cualquier otro componente de la formulación).

En algunas modalidades, el agente tampón comprende ácidos orgánicos, succinato, fosfato, acetato, citrato, ácido cítrico, Tris, HEPES, glutamato, aminoácidos, MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), lactato o mezclas de aminoácidos. En algunas modalidades, el agente tampón comprende ácidos orgánicos, succinato, fosfato, acetato, citrato, ácido cítrico, Tris, HEPES, glutamato, aminoácidos o mezclas de aminoácidos. En algunas modalidades, el agente tampón comprende citrato trisódico dihidrato. En algunas modalidades, el agente tampón comprende succinato, fosfato, acetato, citrato, lactato o glutamato. En algunas modalidades, el agente tampón comprende succinato, fosfato, acetato, citrato o glutamato. En algunas modalidades, el agente tampón comprende citrato trisódico dihidrato. En algunas modalidades, el agente tampón comprende ácido cítrico monohidrato. En algunas modalidades, el agente tampón comprende citrato. En una modalidad, el agente tampón comprende citrato trisódico dihidrato y ácido cítrico monohidrato. En otra modalidad, los agentes tampón son citrato trisódico dihidrato y ácido cítrico monohidrato. En ciertas modalidades, en donde la proteína tiene una carga negativa debido a la presencia de glicanos, el tampón no será histidina.

En una modalidad, el agente tampón presente en la formulación se selecciona para que sea fisiológicamente compatible y para mantener un pH deseado de la formulación farmacéutica. En otra modalidad, el pH de la formulación está por encima de 4. En otra modalidad, el pH de la formulación está entre pH 4,0 y pH 12,0. Por ejemplo, en varias modalidades, el pH de la formulación 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 o 9,0. En algunas modalidades, el pH de la formulación está entre pH 5 y pH 7. En algunas modalidades, el pH de la formulación líquida estable 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 formulación líquida estable es 5,8.

En ciertas modalidades, el tampón es un tampón fosfato para mantener un pH de la formulación farmacéutica de 5 a 7. En ciertas modalidades, el tampón es un tampón citrato para mantener un pH de la formulación farmacéutica de 4,5 a 7. En ciertas modalidades, el tampón es un tampón acetato para mantener un pH de la formulación farmacéutica de 4,5 a 6. En ciertas modalidades, el tampón es un tampón succinato para mantener un pH de la formulación farmacéutica de 4,5 a 5. En ciertas modalidades, el tampón es un tampón glutamato para mantener un pH de la formulación farmacéutica de 5 a 7.

El compuesto tampón 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 tampón, se pueden evitar la cristalización y los cambios de pH. En una modalidad, la concentración del agente tampón es de 0,1 mM a 500 mM (1 M). Por ejemplo, se contempla que el agente tampón 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 tampón 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 ciertas modalidades, el agente tampón 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, la concentración del agente tampón es de 10 mM.

En algunas modalidades, el agente tampón comprende citrato trisódico dihidrato. En algunas modalidades, el agente tampón comprende ácido cítrico monohidrato. En algunas modalidades, el agente tampón comprende citrato. En algunas modalidades, el agente tampón comprende citrato trisódico dihidrato y ácido cítrico monohidrato. En ciertas modalidades, el tampón no será histidina. En algunas modalidades, el agente tampón está presente 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 concentración del agente tampón es de al menos 10 mM.

Agentes estabilizadores

En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento comprenden agentes estabilizadores. Estos agentes estabilizadores se pueden clasificar sobre la base de los mecanismos por los cuales estabilizan las proteínas contra diversas tensiones químicas y físicas. Algunos agentes estabilizadores se utilizan para aliviar los efectos de una tensión específica o para regular una susceptibilidad particular de una proteína específica. Otros agentes estabilizadores tienen efectos más generales sobre las estabilidades físicas y covalentes de las proteínas. Dadas las enseñanzas y la orientación proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica sabrán qué cantidad o rango de agente estabilizador se puede incluir en cualquier formulación en particular para lograr una formulación de la divulgación que probablemente promueva la retención y estabilidad de la proteína de fusión ActRIIA.

En algunas modalidades, se añade un agente estabilizador (o una combinación de agentes estabilizadores) a la formulación para prevenir o reducir la agregación inducida por el

almacenamiento y la degradación química. Una solución opalescente o turbia en el momento de la reconstitución normalmente indica que la proteína se ha precipitado o al menos agregado. Los agentes estabilizadores son capaces de prevenir la agregación o degradación química (por ejemplo, autólisis, desamidación, oxidación, etc.). Algunos agentes estabilizadores también son capaces de actuar como anticoagulantes tras la administración de la formulación a un paciente. En algunas modalidades, el agente estabilizador se selecciona del grupo que consiste en: CMC, dextrosa, PEG, albúmina, kleptose, prolina, sacarosa, trehalosa, manosa, maltosa, lactosa, glucosa, rafinosa, celobiosa, gentiobiosa, isomaltosa, arabinosa, glucosamina, fructosa, manitol, sorbitol, compuestos polihidroxi, polisacáridos, dextrano, almidón, almidón hidroxietílico, ciclodextrinas, N-metilpirolideno, celulosa y ácido hialurónico. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento incluyen agentes estabilizadores 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, almidón hidroxietílico, ciclodextrinas, N-metilpirolideno, celulosa y ácido hialurónico (Carpenter *et al.*, *Develop. Biol. Standard* 74:225, (1991)). En una modalidad de la revelación, la sacarosa se utiliza como agente estabilizador.

En ciertas modalidades, la formulación comprende un agente estabilizador en 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 divulgación, el agente estabilizador 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. En ciertas modalidades, el agente estabilizador tiene una concentración de 2 a 16 % peso/volumen. En ciertas modalidades, el agente estabilizador tiene una concentración de 6 a 10 % peso/volumen. En ciertas modalidades, el agente estabilizador tiene una concentración de al menos 8 % peso/volumen. En ciertas modalidades, el agente estabilizador es sacarosa y tiene una concentración de 2 a 16 % peso/volumen. En ciertas modalidades, el agente estabilizador es sacarosa y tiene una concentración entre 6 a 10 % peso/volumen. En ciertas modalidades, el agente estabilizador es sacarosa y tiene una concentración de al menos 8 % peso/volumen.

Tensioactivos

En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente 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 (normalmente 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 el presente 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.

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 polisorbatos 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. Este tipo 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 del polisorbato de unión). Como alternativa, 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 polisorbatos 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 se deriva de la adición de estabilizador 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.

Los tensioactivos también se agregan en cantidades adecuadas para prevenir el fenómeno de agregación relacionado con la superficie (Chang, B, *J. Pharm. Sci.* 85:1325, (1996)). Por lo tanto, los tensioactivos a modo de ejemplo incluyen, entre otros, tensioactivos aniónicos, catiónicos, no iónicos, zwitteriónicos y anfóteros, incluyendo los tensioactivos derivados de aminoácidos naturales. Los tensioactivos aniónicos incluyen, entre otros, lauril sulfato de sodio, dioctil sulfosuccinato de sodio y sulfonato de dioctilo de sodio, ácido quenodesoxicólico, sal sódica de N-lauroilsarcosina, dodecil sulfato de litio, sal sódica del ácido 1-octanosulfónico, colato de sodio hidratado, desoxicolato de sodio y sal sódica del 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 dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG); éster de ácidos grasos sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. En ciertas modalidades, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en Polisorbato-20, Polisorbato-80, Poloxámero-124, Poloxámero-127, Poloxámero-188 y Poloxámero-407. En ciertas modalidades, el tensioactivo es Polisorbato-80. En ciertas modalidades, el tensioactivo es Polisorbato-20. En ciertas modalidades, el tensioactivo es Polisorbato-188.

En algunas modalidades, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en: lauril sulfato de sodio, dioctil sulfosuccinato de sodio y sulfonato de dioctilo de sodio, ácido quenodesoxicólico, sal sódica de N-lauroilsarcosina, dodecil sulfato de litio, sal sódica del ácido 1-octanosulfónico, colato de sodio hidratado, desoxicolato de sodio y sal sódica del ácido glicodesoxicólico, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio monohidrato, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, CHAPS, CHAPSO, SB3-

10, SB3-12, digitonina, Triton X-100, Triton X-114, TWEEN-20, TWEEN-80, laurmacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado polioxietileno 10, 40, 50 y 60, monostearato de glicerol, Polisorbato-20, Polisorbato-40, Polisorbato-60, Polisorbato-65, Polisorbato-80, Poloxámero-188 y lecitina de soya. En ciertas modalidades, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en Poloxámero-188, dodecil sulfato de sodio (SDS), N-dodecil- β -D-maltósido (DDM), Polisorbato-20 y Triton X. En ciertas modalidades, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en Polisorbato-20, Polisorbato-80, Poloxámero-124, Poloxámero-127, Poloxámero-188 y Poloxámero-407.

Por lo tanto, se proporcionan además formulaciones que comprenden estos tensioactivos, ya sea individualmente o como una mezcla en diferentes proporciones. En las formulaciones actuales, el tensioactivo se incorpora en una concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 mg/ml. En las formulaciones actuales, el tensioactivo se incorpora en una concentración de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 mg/ml. En las formulaciones actuales, el tensioactivo se incorpora en una concentración de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 mg/ml. En varias modalidades de las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente 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 mg/ml. En las formulaciones actuales, el tensioactivo se incorpora en una concentración de 0,2 mg/ml. Del mismo modo, en ciertas modalidades de la divulgación, 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 % de peso/volumen.

En algunas modalidades, el tensioactivo es Polisorbato-80. En algunas modalidades, el tensioactivo está presente en la formulación a una concentración de 0,05 a 0,3 mg/ml. En algunas modalidades, el tensioactivo está presente a una concentración de 0,2 mg/ml. En algunas modalidades, el tensioactivo está presente a una concentración de 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 % peso/volumen. En algunas modalidades, el tensioactivo está presente a una concentración de al menos 0,02 % peso/volumen.

Antioxidantes

En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen uno o más antioxidantes. La oxidación de los residuos de proteínas surge de una serie de fuentes diferentes. Más allá de la adición de antioxidantes específicos, la

prevención del daño oxidativo de las proteínas implica el control cuidadoso de una serie de factores a lo largo del proceso de fabricación y almacenamiento del producto, como el oxígeno atmosférico, la temperatura, la exposición a la luz y la contaminación química.

Por lo tanto, la divulgación contempla el uso de antioxidantes farmacéuticos, incluyendo, entre otros, agentes reductores, eliminadores de oxígeno/radicales libres o agentes quelantes. Los antioxidantes en las formulaciones de proteínas terapéuticas son, en un aspecto, solubles en agua y permanecen activos durante toda la vida útil del producto. Los agentes reductores y los eliminadores de oxígeno/radicales libres funcionan mediante la ablación de especies activas de oxígeno en solución. En algunas modalidades de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento, la concentración de antioxidantes 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 mg/ml.

En una modalidad, las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento comprenden metionina (forma L o D), triptófano (forma L o D), dimercaprol o piridoxina. En una modalidad, las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento comprenden metionina (forma L o D), triptófano (forma L o D) o piridoxina. En una modalidad, las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento comprenden metionina (forma L o D). En una modalidad, las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento comprenden L-metionina. En una modalidad, las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento comprenden D-metionina.

En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden incluir de 1 a 50 mM de un antioxidante. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden incluir de 1 a 30 mM de un antioxidante. En una modalidad, las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden incluir de 1 a 20 mM de un antioxidante. Las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden incluir de 5 a 15 mM de un antioxidante. Las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden incluir de 5 a 10 mM de un antioxidante. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen 5 mM, 10 mM o 50 mM de un antioxidante. Las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden incluir 10 mM o al menos 10 mM de un antioxidante.

En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden incluir de 1 a 50 mM de L-metionina. En ciertas modalidades, las

formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden incluir de 1 a 30 mM de L-metionina. En una modalidad, las formulaciones farmacéuticas descritas en la presente memoria también pueden incluir de 1 a 20 mM de L-metionina. Las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden incluir de 5 a 15 mM de L-metionina. Las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden incluir de 5 a 10 mM de L-metionina. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen 5 mM, 10 mM o 50 mM de L-metionina. Las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden incluir 10 mM o al menos 10 mM de L-metionina.

Agentes quelantes

En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden incluir opcionalmente uno o más agentes quelantes. En ciertas modalidades, el agente quelante es DTPA o EDTA. Las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 μ M de un agente quelante. En ciertas modalidades, la formulación líquida estable incluye de 1 a 100 μ M, de 1 a 30 μ M, 1 a 20 μ M, 10 μ M -30 μ M de DTPA o EDTA. En ciertas modalidades, la formulación líquida estable incluye de 7,5 a 100 μ M de DTPA o EDTA.

En ciertas modalidades, la formulación líquida estable incluye 10 μ M de DTPA o EDTA.

Formulaciones de proteínas ActRIIA

En algunas modalidades de las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento, comprenden de 1 a 100 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana, de 10 a 50 mM de tampón citrato, de 2 a 16 % peso/volumen de sacarosa, de 0,05 a 0,5 mg/ml de Polisorbato-80, Polisorbato-20 o Poloxámero-188, de 0 a 50 mM de L-metionina y de 0 a 100 μ M de DTPA o EDTA. En otras modalidades de las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento, comprenden 50 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana de la SEQ ID NO: 32, o una variante de la SEQ ID NO: 32 que carece de lisina C-terminal, 10 mM de tampón citrato, 8 % peso/volumen de sacarosa, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80 y 20 mM de L-metionina. En otras modalidades de las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento, comprenden 50 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana de la SEQ ID NO: 32, 10 mM de tampón

citrato, 8 % peso/volumen de sacarosa, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80 y 20 mM de L-metionina.

En algunas modalidades de las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento, comprenden de 10 a 100 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana, de 10 a 50 mM de tampón citrato, de 2 a 16 % peso/volumen de sacarosa, de 0,05 a 0,5 mg/ml de Polisorbato-80, Polisorbato-20 o Poloxámero-188, de 0 a 50 mM de L-metionina y de 0 a 100 μ M de DTPA o EDTA. En otras modalidades de las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento, comprenden 50 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana de la SEQ ID NO: 41, 10 mM de tampón citrato, 8 % peso/volumen de sacarosa, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80 y 20 mM de L-metionina.

En algunas modalidades de las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento, comprenden de 10 a 100 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana, de 10 a 50 mM de tampón citrato, de 2 a 16 % peso/volumen de sacarosa, de 0,05 a 0,5 mg/ml de Polisorbato-80, Polisorbato-20 o Poloxámero-188, de 0 a 50 mM de L-metionina y de 0 a 100 μ M de DTPA o EDTA. En otras modalidades de las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento, comprenden 50 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIA humana de una mezcla de la SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 41, 10 mM de tampón citrato, 8 % peso/volumen de sacarosa, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80 y 20 mM de L-metionina.

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.

Estabilidad

En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas líquidas se almacenan en condiciones refrigeradas (rango de temperatura: por lo general de aproximadamente 2 a 8 °C, pero bajo ciertas circunstancias, la formulación acuosa puede exhibir estabilidad a otras temperaturas, incluyendo aproximadamente 25 °C y aproximadamente 40 °C durante períodos de hasta aproximadamente 3, 6, 9 o 12 meses). En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento son estables cuando se almacenan de 2 a 8 °C. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento son estables cuando se almacenan de 2 a 8 °C

durante 1, 3, 6 o 12 meses. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento son estables cuando se almacenan a 5 °C. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento son estables cuando se almacenan de 2 a 8 °C durante 1, 3, 6 o 12 meses. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento son estables cuando se almacenan a 5 °C. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento son estables cuando se almacenan entre 25 °C durante 1, 3, 6 o 12 meses. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento son estables cuando se almacenan a 5 °C. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento son estables cuando se almacenan entre 40 °C durante 1, 3, 6 o 12 meses.

Kits

La presente divulgación proporciona un kit que comprende una formulación farmacéutica proporcionada en el presente documento y un dispositivo de inyección. En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica comprende una proteína ActRIIA o una proteína de fusión 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 a la SEQ ID NO: 9, a la SEQ ID NO: 32 o a la SEQ ID NO: 41, 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 a GDF11.

En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende una proteína que 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 la SEQ ID NO: 9, a la SEQ ID NO: 32 o a la SEQ ID NO: 41. En ciertas modalidades de este tipo, la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 95 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 9, a la SEQ ID NO: 32 o a la SEQ ID NO: 41, en donde la proteína se une a la activina y/o a GDF11. En ciertas modalidades, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9,

SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 41. En otras modalidades, la proteína consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 41.

En algunas modalidades, la formulación farmacéutica 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 de la SEQ ID NO: 41. En ciertas modalidades, la proteína consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41. En otras modalidades, la proteína consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41.

En algunas modalidades, la formulación farmacéutica 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 de la SEQ ID NO: 9. En ciertas modalidades, la proteína consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9. En otras modalidades, la proteína consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9.

En algunas modalidades, la formulación farmacéutica 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 de la SEQ ID NO: 32. En ciertas modalidades, la proteína consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32. En otras modalidades, la proteína consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32.

En ciertas modalidades de lo anterior, la proteína 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.

En ciertas modalidades, la proteína de fusión ActRIIA es parte de un complejo de proteínas homodímero.

En ciertas modalidades, la proteína ActRIIA está glicosilada.

La presente divulgación proporciona un kit que comprende una formulación farmacéutica descrita en el presente documento y un dispositivo de inyección. En ciertas modalidades, el kit comprende una formulación farmacéutica descrita en el presente documento y un dispositivo de inyección. En algunas modalidades de los kits descritos en

este documento, la formulación farmacéutica que comprende la proteína se rellena previamente en uno o más recipientes, tal como un autoinyector.

En ciertas modalidades, el rango de pH para la formulación farmacéutica que comprende una proteína es de 5 a 7. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica que comprende una proteína comprende además un agente tampón. En algunas modalidades, el agente tampón se añade en una cantidad de al menos 10 mM. En algunas modalidades, el agente tampón se añade en una cantidad en el rango de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM. En algunas modalidades, el agente tampón comprende citrato.

En algunas modalidades, la formulación farmacéutica que comprende una proteína comprende además un tensioactivo. En algunas modalidades, el tensioactivo comprende un polisorbato. En algunas modalidades, el tensioactivo comprende Polisorbato-80 o Polisorbato-20.

En algunas modalidades, la formulación farmacéutica que comprende una proteína comprende además un azúcar, tal como los disacáridos (p. ej., sacarosa). En algunas modalidades, la formulación farmacéutica líquida estable que comprende una proteína comprende sacarosa, trehalosa, manitol, polivinilpirrolidona (PVP), dextrosa y/o glicina. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica que comprende una proteína comprende sacarosa. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende una proteína y un azúcar en una proporción en peso de al menos 1:1 proteína a azúcar. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende una proteína y un azúcar en una proporción en peso de 1:1 a 1:10 de proteína a azúcar. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende una proteína y un azúcar en una proporción en 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 azúcar. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende una proteína y un azúcar en una proporción en peso de 1:6 proteína a azúcar. En ciertas modalidades de lo anterior, la formulación farmacéutica comprende una proteína y un azúcar en una cantidad suficiente para estabilizar la proteína.

En ciertas modalidades de los kits descritos en el presente documento, el dispositivo de inyección comprende una jeringa. En ciertas modalidades de este tipo, la jeringa está precargada con una formulación líquida estable.

En ciertas modalidades de los kits descritos en el presente 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 ciertas modalidades de los kits descritos en el presente documento, el kit comprende además un autoinyector para su uso en la administración de la solución inyectable estéril. En algunas modalidades, la solución inyectable estéril se autoadministra. En algunas modalidades, la solución inyectable estéril comprende una dosis terapéuticamente eficaz. En algunas modalidades, la dosis terapéuticamente eficaz comprende una dosis basada en el peso.

Proteínas ActRIIA

En ciertas modalidades, la presente divulgación se refiere a proteínas ActRIIA. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “ActRIIA” se refiere a una familia de proteínas receptoras de activina tipo IIA (ActRIIA) de cualquier especie y variantes derivadas de dichas proteínas ActRIIA por mutagénesis u otra modificación. La referencia a ActRIIA en el presente documento se entiende como una referencia a cualquiera de las formas identificadas actualmente. 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 de serina/treonina quinasa predicha.

El término “proteína ActRIIA” incluye proteínas que comprenden cualquier proteína natural de un miembro de la familia ActRIIA, así como cualquier variante de la misma (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil. A lo largo de la presente divulgación, 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 ActRIIA, que se incorporan aquí por referencia en su totalidad. La numeración de aminoácidos para todas las proteínas relacionadas con ActRIIA descritas en el presente 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.

La secuencia precursora canónica de la proteína 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
PLQLLEVkar

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 QHPSLEDMQE VVVHKKKRPV
LRDYWQKHAG

451 MAMLCETIEE CWDHDAEARL SAGCVGERIT QMQRLTNIIT
TEDIVTVVTM

501 VTNVDFPPKE SSL (SEQ ID NO: 9)

El péptido señal se indica con un subrayado sencillo; el dominio extracelular se indica en **negrita**; y los posibles sitios endógenos de N-glicosilación se indican con un subrayado doble.

La secuencia de la proteína ActRIIA humana extracelular procesada (madura) es la siguiente:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGD~~DKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG~~
CW~~LD~~DDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 10)

La “cola” C-terminal del dominio extracelular se indica con un subrayado sencillo. La secuencia con la “cola” eliminada (una secuencia $\Delta 15$) es la siguiente:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGD~~DKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG~~
CW~~LD~~DDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM (SEQ ID NO: 11)

La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína precursora de ActRIIA humana se muestra a continuación (SEQ ID NO: 12), como se indica a continuación los

nucleótidos 159-1700 de la secuencia de referencia de Genbank NM_001616.4. La secuencia de señales está subrayada.

1 ATGGGAGCTG CTGCAAAGTT GCGTTTGCC GTCTTTCTTA
TCTCCTGTTC

51 TTCAGGTGCT ATACTTGGTA GATCAGAAAC TCAGGAGTGT
CTTTTCTTTA

101 ATGCTAATTG GGAAAAAGAC AGAACCAATC AACTGGTGT
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
CCCCACCTT

551 CTCCATTACT AGGTTTGAAA CCACTGCAGT TATTAGAAGT
GAAAGCAAGG

601 GGAAGATTTG GTTGTGTCTG GAAAGCCCAG TTGCTTAACG
AATATGTGGC

651 TGTCAAAATA TTTCCAATAC AGGACAAACA GTCATGGCAA
AATGAATACG

701 AAGTCTACAG TTTGCCTGGA ATGAAGCATG AGAACATATT
ACAGTTCATT

751 GGTGCAGAAA AACGAGGCAC CAGTGTTGAT GTGGATCTTT
GGCTGATCAC

801 AGCATTTTCAT GAAAAGGGTT CACTATCAGA CTTTCTTAAG
GCTAATGTGG

851 TCTCTTGGAA TGAAGTGTGT CATATTGCAG AAACCATGGC
TAGAGGATTG

901 GCATATTTAC ATGAGGATAT ACCTGGCCTA AAAGATGGCC
ACAAACCTGC

951 CATATCTCAC AGGGACATCA AAAGTAAAAA TGTGCTGTTG
AAAAACAACC

1001 TGACAGCTTG CATTGCTGAC TTTGGGTTGG CCTTAAATT
TGAGGCTGGC

1051 AAGTCTGCAG GCGATACCCA TGGACAGGTT GGTACCCGGA
GGTACATGGC

1101 TCCAGAGGTA TTAGAGGGTG CTATAAACTT CCAAAGGGAT
GCATTTTTGA

1151 GGATAGATAT GTATGCCATG GGATTAGTCC TATGGGAAT
GGCTTCTCGC

1201 TGTACTGCTG CAGATGGACC TGTAGATGAA TACATGTTGC
CATTTGAGGA

1251 GGAAATTGGC CAGCATCCAT CTCTTGAAGA CATGCAGGAA
GTTGTTGTGC

1301 ATAAAAAAA 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)

La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína ActRIIA humana soluble
(extracelular) procesada es la siguiente:

1 ATACTTGGTA 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(SEQ ID NO:13)

ActRIIA está bien conservado entre los vertebrados, con grandes tramos del dominio extracelular completamente conservados. Por ejemplo, la Figura 1 muestra una alineación de múltiples secuencias de un dominio extracelular de ActRIIA humano en comparación con varios ortólogos de ActRIIA. Muchos de los ligandos que se unen a ActRIIA también están altamente conservados. Por consiguiente, 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 variante de ActRIIA humana útil, de acuerdo con los métodos actualmente descritos, 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.

Sin querer limitar, los siguientes ejemplos ilustran este enfoque para definir una variante activa de ActRIIA. Como se ilustra en la Figura 1, F13 en el dominio extracelular humano es Y en *Ovis aries* (SEQ ID NO: 62), *Gallus* (SEQ ID NO: 65), *Bos Taurus* (SEQ ID NO: 66), *Tyto alba* (SEQ ID NO: 67) y *Myotis davidii* (SEQ ID NO: 68) ActRIIA, lo que indica que los residuos aromáticos son tolerados en esta posición, incluyendo F, W y Y. Q24 en el dominio extracelular humano es R en *Bos Taurus* ActRIIA, lo que indica que los residuos cargados serán tolerados en esta posición, incluyendo D, R, K, H y E. S95 en el dominio extracelular humano es F en *Gallus gallus* y *Tyto alba* ActRIIA, 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 *Ovis aries* ActRIIA, lo que indica que los residuos ácidos son tolerados en esta posición, incluyendo D y E. P29 en el dominio extracelular humano está relativamente poco conservado, apareciendo como S en *Ovis aries* ActRIIA y L en *Myotis davidii* ActRIIA, por lo que esencialmente cualquier aminoácido debe ser tolerado en esta posición.

Además, como se discutió anteriormente, las proteínas ActRII 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. nro.: 7,709,605, 7,612,041 y 7,842,663). Además de las enseñanzas del presente documento, estas referencias proporcionan una amplia orientación sobre cómo generar variantes de ActRII que retengan una o más actividades deseadas (p. ej., la actividad de unión a ligandos).

Por ejemplo, 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). Por consiguiente, los dominios centrales de unión al ligando de ActRIIA humanos, demarcados por la más externa de estas cisteínas conservadas, corresponden a las posiciones 30 a 110 de la 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-terminal 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-terminal sin alterar necesariamente la unión del ligando. Los truncamientos a modo de ejemplo de los dominios extracelulares de ActRIIA incluyen las SEQ ID NO: 10 y 11.

Por consiguiente, 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 a 110 de la SEQ ID NO: 9. Por lo tanto, las proteínas ActRIIA pueden, por ejemplo, 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 que corresponde a cualquiera de los aminoácidos 21 a 30 (p. ej., comenzando en cualquiera de los aminoácidos 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30) de la SEQ ID NO: 9 y terminando en una posición que corresponde a cualquiera de los aminoácidos 110 a 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) de la SEQ ID NO: 9. Otros ejemplos incluyen construcciones que comienzan en una posición seleccionada entre 21 a 30 (p. ej., comenzando en cualquiera de los aminoácidos 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30), 22 a 30 (p. ej., comenzando en cualquiera de los aminoácidos 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30), 23 a 30 (p. ej., comenzando en cualquiera de los aminoácidos 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30), 24 a 30 (p. ej., comenzando en cualquiera de los aminoácidos 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30) de la SEQ ID NO: 9, y terminando en una posición seleccionada entre 111 a 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 a 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 a 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 a 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 a 135 (p. ej., terminando en cualquiera de los aminoácidos 130, 131, 132, 133, 134 o 135), 111 a 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 a 133 (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 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 de la 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 % idéntica a los aminoácidos 30 a 110 de la 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 % idéntica a los aminoácidos 30 a 110 de la SEQ ID NO: 9, y que comprende no más de 1, 2, 5, 10 o 15 cambios conservadores de aminoácidos en el sitio de unión al ligando.

En ciertas modalidades, la divulgación 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., la señalización de 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 divulgación 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 que comienza en un residuo que corresponde a los aminoácidos 21 a 30 (p. ej., comenzando en cualquiera de los aminoácidos 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30) de la SEQ ID NO: 9 y terminando en una posición que corresponde a cualquiera de los aminoácidos 110 a 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) de la SEQ ID NO: 9. En algunas modalidades, las proteínas ActRIIA comprenden, consisten 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 a 110 de la SEQ ID NO: 9. En ciertas modalidades, las proteínas ActRIIA

comprenden, consisten 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 a 135 de la SEQ ID NO:

9. En algunas modalidades, las proteínas ActRIIA o la proteína de fusión ActRIIA comprenden, consisten 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 las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 32, 36, 39 y 41.

En algunas modalidades, la proteína de fusión 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 de la SEQ ID NO: 32. En algunas modalidades, la proteína de fusión ActRIIA comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32. En algunas modalidades, la proteína de fusión ActRIIA consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32. En algunas modalidades, la proteína de fusión ActRIIA es parte de un complejo de proteínas homodímeras. En algunas modalidades, la proteína de fusión ActRIIA está glicosilada. En algunas modalidades, la proteína de fusión ActRIIA tiene un patrón de glicosilación que se puede obtener por expresión en una célula de ovario de hámster chino.

En algunas modalidades alternativas, la proteína ActRII (p. ej., SEQ ID NO: 32) carece de la lisina C-terminal. En algunas modalidades, la proteína ActRII que carece de la lisina C-terminal es la SEQ ID NO: 41. En algunas modalidades, la formulación comprende una mezcla de la SEQ ID NO:32 y SEQ ID NO: 41.

En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento contienen una mezcla de la SEQ ID NO: 32 y una variante de la SEQ ID NO: 32 que carece del residuo de lisina C-terminal (SEQ ID NO: 41). En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica descrita en el presente documento contiene una mezcla de la SEQ ID NO: 32 y una variante de la 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 de la SEQ ID NO: 32.

En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica descrita en el presente documento contiene una mezcla de la SEQ ID NO: 32 y una variante de la 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 de la SEQ ID NO: 32.

En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica descrita en el presente documento contiene una mezcla de la SEQ ID NO: 32 y una variante de la 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 de la SEQ ID NO: 41.

En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica descrita en el presente documento contiene una mezcla de la SEQ ID NO: 32 y una variante de la 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 de la SEQ ID NO: 41.

18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % en peso de la SEQ ID NO: 41.

En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica descrita en el presente documento contiene el 100 % de la SEQ ID NO: 32 en peso. En ciertas modalidades, la formulación farmacéutica descrita en el presente documento contiene el 100 % de la SEQ ID NO: 41 en peso.

En ciertos aspectos, la presente divulgación se refiere a las proteínas trampa de GDF (también denominadas “trampas GDF”). En algunas modalidades, las trampas GDF de la presente divulgación son proteínas ActRII variantes (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 salvaje” o no modificada) de modo que la proteína ActRIIA variante tiene una o más actividades de unión al ligando alteradas que la proteína ActRIIA de tipo salvaje correspondiente. En algunas modalidades, las proteínas trampa GDF de la presente divulgación conservan al menos una actividad similar a la de una proteína ActRIIA de tipo salvaje correspondiente. Por ejemplo, las trampas 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 divulgación se unen e inhiben aún más uno o más de los ligandos de GDF/BMP. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona proteínas trampa GDF que tienen una especificidad de unión alterada para uno o más ligandos ActRII.

Para ilustrar, 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 es 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 salvaje. 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 salvaje. 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

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona un método para tratar la hipertensión arterial pulmonar (PAH), que comprende administrar una formulación farmacéutica descrita en el presente documento a un paciente que la necesita.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona una formulación farmacéutica para el tratamiento de la PAH en un sujeto que lo necesita que comprende administrar una proteína ActRIIA humana liofilizada unida a un dominio constante de una inmunoglobulina, en donde el régimen de dosificación comprende: 1) administrar una dosis inicial de 0,3 mg/kg; 2) administrar una dosis posterior de 0,7 mg/kg tres semanas después de la dosis inicial; y 3) monitorear la respuesta de un sujeto; y 4) modificar la dosis posterior; y en donde al sujeto se le administra la dosis posterior cada tres semanas. En algunas modalidades, la dosis posterior se modifica en función de la respuesta del sujeto.

En ciertos aspectos, la divulgación prevé un método para tratar la hipertensión arterial pulmonar (PAH), que comprende administrar una formulación farmacéutica descrita en el presente 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 (PVR); un aumento en la distancia de caminata de 6 minutos (6MWD); una disminución de los niveles del péptido natriurético tipo B N-terminal (NT-proBNP); 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.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona un método para tratar la hipertensión arterial pulmonar (PAH), que comprende administrar una formulación farmacéutica descrita en el presente 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 (FC) de la OMS y retrasa la progresión de la enfermedad, incluyendo reducir el riesgo de muerte y hospitalización por PAH.

En ciertos aspectos, la divulgación prevé 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 administrar a un paciente que lo necesite de una formulación

farmacéutica descrita en el presente documento, en donde la administración de dicha proteína da como resultado un cambio en uno o más de los siguientes parámetros hemodinámicos o funcionales: una reducción de la resistencia vascular pulmonar (PVR); un aumento en la distancia de caminata de 6 minutos (6MWD); una disminución de los niveles de propéptido natriurético tipo B N-terminal (NT-proBNP); 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 del músculo liso y/o endoteliales en la arteria pulmonar, angiogénesis en la arteria pulmonar, disnea, dolor torácico, remodelación vascular pulmonar, hipertrofia ventricular derecha y fibrosis pulmonar.

En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento reduce la PVR en el paciente. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento reduce la PVR 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 PVR del paciente en al menos un 20 %. En algunas modalidades, la reducción de la PVR 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 el presente documento aumenta la distancia de caminata de 6 minutos del paciente. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente 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 el presente 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 el presente documento disminuye los niveles de NT-proBNP en el paciente. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente 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 el presente 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 el presente documento disminuye los niveles de NT-proBNP a niveles normales. En algunas modalidades, el nivel normal de NT-proBNP es de < 100 pg/ml.

En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente 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 el presente documento previene o reduce la progresión de la clase funcional de la hipertensión pulmonar de la clase funcional I a la clase II, según lo reconocido por la OMS. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento previene o reduce la progresión de la clase funcional de la hipertensión pulmonar de la clase funcional II a la Clase III, según lo reconocido por la OMS. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento previene o reduce la progresión de la clase funcional de la hipertensión pulmonar de la clase funcional III a la clase IV, según lo reconocido por la OMS. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente 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 el presente 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 el presente 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 el presente 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.

En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente 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 la fracción de cambio de área 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 la fracción de cambio de área del ventrículo derecho y en la fracción de eyección.

En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente 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 el presente 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 el presente documento mejora la presión auricular derecha media (mRAP) en el paciente. En algunas modalidades, la mejora en mRAP es una reducción en la mRAP. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente 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 el presente 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.

En algunas modalidades, el paciente tiene una resistencia vascular pulmonar (PVR) mayor o igual a 3 unidades 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 el presente 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 el presente 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; un 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 un 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.

En algunas modalidades, PAH es hipertensión arterial pulmonar (PAH) idiopática. En algunas modalidades, la PAH es PAH hereditaria. En algunas modalidades, la PAH es PAH inducida por fármacos o toxinas. En algunas modalidades, la PAH es PAH asociada con cortocircuitos sistémico-pulmonares congénitos simples al menos 1 año después de la reparación del cortocircuito. En algunas modalidades, el paciente tiene hipertensión pulmonar de clase funcional II o Clase III, según 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, según 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, según 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 el presente documento aumenta la supervivencia libre de trasplante en el paciente. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente 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 el presente documento disminuye la hipertrofia ventricular derecha en el paciente. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente 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 el presente documento disminuye la hipertrofia del músculo liso en el paciente. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente 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 el presente documento disminuye la musculatura de las arteriolas pulmonares en el paciente. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento disminuye la musculatura de las arteriolas pulmonares 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 mejora la capacidad de ejercicio del paciente. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento disminuye el índice de disnea de Borg (BDI) del paciente. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente 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 el presente documento mejora aún más la función renal. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento retrasa el empeoramiento clínico de la hipertensión arterial pulmonar. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente 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 el presente 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 la presente memoria 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 PAH; necesidad de aumentar la prostaciclina en al menos un 10 %; necesidad de septostomía auricular; hospitalización específica por PAH durante al menos 24 horas; y deterioro de la PAH. En algunas modalidades, el deterioro de la PAH comprende un empeoramiento de la clase funcional de la OMS y una disminución de la 6MWD de al menos 15 %. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento reduce el riesgo de muerte asociado con la hipertensión arterial pulmonar. En algunas modalidades, la administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente 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.

En ciertas modalidades, el paciente tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento es de sexo femenino. En ciertas modalidades, el paciente tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento es de sexo masculino. En ciertas modalidades, el paciente tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento tiene cualquier edad. En ciertas modalidades, el paciente tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento tiene menos de 18 años. En una modalidad específica, el paciente tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento tiene menos de 13 años. En otra modalidad específica, el paciente tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento tiene menos de 12, menos de 11, menos de 10, menos de 9, menos de 8, menos de 7, menos de 6 o menos de 5 años. En otra modalidad específica, el paciente tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento tiene de 1 a 3 años, de 3 a 5 años, de 5 a 7 años, de 7 a 9 años, de 9 a 11 años, de 11 a 13 años, de 13 a 15 años, de 15 a 20 años, de 20 a 25 años, de 25 a 30 años o más de 30 años. En otra modalidad específica, el paciente tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento tiene de 30 a 35 años, de 35 a 40 años, de 40 a 45 años, de 45 a 50 años, de 50 a 55 años, de 55 a 60 años o más de 60 años. En otra modalidad específica, el paciente tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento tiene de 18 a 64 años,

de 65 a 74 años o más de 75 años.

En ciertas modalidades, los niveles de hemoglobina en un paciente tratado de acuerdo con las formas farmacéuticas y métodos proporcionados en el presente 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 farmacéuticas y métodos proporcionados en el presente documento se encuentran 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.

Métodos de administración

En el presente documento se describen los métodos de administración de las formulaciones líquidas aquí descritas. Las formulaciones líquidas descritas en el presente documento se pueden administrar a un paciente por vía parenteral, tal como una inyección (p. ej., subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, etc.) o administración percutánea, mucosa, nasal, pulmonar u oral. En ciertas modalidades, las formulaciones líquidas se administran por vía subcutánea.

Además, en el presente documento se describen métodos para administrar a un paciente cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en el presente documento, que comprenden la administración al paciente de cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en el presente documento con un dispositivo de administración, tal como una pluma inyectora reutilizable o un dispositivo de administración autoinyector. En ciertas modalidades, las formulaciones líquidas se administran utilizando una pluma inyectora reutilizable o dispositivo de administración autoinyector. En ciertas modalidades, las formulaciones líquidas descritas en el presente documento se administran utilizando un dispositivo de administración autoinyector.

Se pueden utilizar numerosos dispositivos de administración autoinyectores o plumas inyectoras reutilizables para administrar subcutáneamente las formulaciones farmacéuticas de la presente invención. Los ejemplos incluyen, entre otros, Molly™ y/o DAI™ y/o PSDI™ (SHL Medical, Zug, Suiza) y otros fabricantes Autopen® (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Reino Unido), Disetronic Pen (*Disetronic Medical Systems*, Bergdorf, Suiza), pluma inyectora Humalog® Mix75/25™, pluma inyectora Humalog®, pluma inyectora Humulin® 70/30 (Eli Lilly and Co., Indianapolis, Ind.), NovoPen® I, II y III (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), NovoPen® Junior (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), pluma inyectora BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey), OptiPen®,

OptiPen Pro®, OptiPen Starlet™ y OptiClik® (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Alemania).

Ejemplos de plumas inyectoras o dispositivos de administración autoinyectores desechables que tienen aplicaciones en la administración subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, entre otros, la pluma inyectora SoloSTAR® (Sanofi-Aventis), FlexPen® (Novo Nordisk) y KwikPen™ (Eli Lilly), autoinyector SureClick™ (Amgen, Thousand Oaks, California), Penlet® (Haselmeier, Stuttgart, Alemania), EpiPen® (Dey, L. P.), y pluma inyectora Humira® (Abbott Labs, Abbott Park, Illinois).

En ciertas modalidades, las formulaciones líquidas descritas en el presente documento se administran utilizando una pluma inyectora reutilizable o un dispositivo de administración autoinyector en donde la pluma inyectora reutilizable o los dispositivos de administración de autoinyectores comprenden una jeringa precargada. En ciertas modalidades, la capacidad de la jeringa precargada se selecciona de una jeringa de 0,5 ml a 10 ml. En ciertas modalidades, la capacidad de la jeringa precargada es de 0,5 ml, 0,75 ml, 1,0 ml, 1,25 ml, 1,5 ml, 1,75 ml, 2,0 ml, 2,25 ml, 2,5 ml, 2,75 ml, 3,0 ml, 3,25 ml, 3,5 ml, 3,75 ml, 4,0 ml, 4,25 ml, 4,5 ml, 4,75 ml, 5,0 ml, 5,25 ml, 5,5 ml, 5,75 ml, 6,0 ml, 6,25 ml, 6,5 ml, 6,75 ml, 7,0 ml, 7,25 ml, 7,5 ml, 7,75 ml, 8,0 ml, 8,25 ml, 8,5 ml, 8,75 ml, 9,0 ml, 9,25 ml, 9,5 ml, 9,75 ml, 10,0 ml de cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en este documento.

En ciertas modalidades, la jeringa precargada contiene cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento en donde la concentración de la proteína ActRIIA es de 5 mg/ml a 100 mg/ml. En ciertas modalidades, la concentración de la proteína ActRIIA es de 5 mg/ml a 50 mg/ml. En ciertas modalidades, la concentración de la proteína ActRIIA es de 8,3 mg/ml a 50 mg/ml. En ciertas modalidades, la concentración de la proteína ActRIIA es de 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 40 mg/ml, 45 mg/ml, 50 mg/ml, 55 mg/ml, 60 mg/ml, 65 mg/ml, 70 mg/ml, 75 mg/ml, 80 mg/ml, 85 mg/ml, 90 mg/ml, 95 mg/ml o 100 mg/ml.

En una modalidad, la pluma inyectora reutilizable o el dispositivo de administración autoinyector contiene una aguja con un calibre de 27 G o menos de diámetro. En una modalidad, el calibre de la aguja varía en tamaño de 25 G a 33 G (incluyendo los rangos intermedios a los mismos, p. ej., 25 sG, 26, 26 sG, 27 G, 28 G, 29 G, 30 G, 31 G, 32 G y 33 G). En una modalidad, se elige el diámetro de aguja más pequeño y la longitud apropiada de acuerdo con las características de viscosidad de la formulación y el dispositivo utilizado para administrar la formulación de la invención.

En ciertas modalidades, las formulaciones líquidas descritas en el presente documento se administran utilizando un dispositivo de administración autoinyector o una pluma inyectora reutilizable en donde el volumen entregado de cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en el presente documento es de 1 ml a 2 ml. En ciertas modalidades, el volumen suministrado de cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en el presente documento es de 1,0 ml, 1,1 ml, 1,2 ml, 1,3 ml, 1,4 ml, 1,5 ml, 1,6 ml, 1,7 ml, 1,8 ml, 1,9 ml o 2,0 ml. En ciertas modalidades, el volumen suministrado de cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en el presente documento es de 1,8 ml.

En ciertas modalidades, la pluma inyectora reutilizable o el dispositivo de administración autoinyector son útiles para la inyección de cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en el presente documento dentro de un rango de 1 a 5 segundos. En ciertas modalidades, la pluma inyectora reutilizable o el dispositivo de administración autoinyector son útiles para la inyección de cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en el presente documento dentro de un rango de 1 a 4 segundos. En ciertas modalidades, la pluma inyectora reutilizable o el dispositivo de administración autoinyector son útiles para la inyección de cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en el presente documento dentro de un rango de 1 a 3 segundos. En ciertas modalidades, la pluma inyectora reutilizable o el dispositivo de administración autoinyector permite la inyección de cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en el presente documento dentro de un rango de 2 a 3 segundos. En ciertas modalidades, la pluma inyectora reutilizable o el dispositivo de administración autoinyector permite la inyección de cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en el presente documento dentro de un rango de 2 a 4 segundos. En ciertas modalidades, la pluma inyectora reutilizable o el dispositivo de administración autoinyector permite la inyección de cualquiera de las formulaciones líquidas descritas dentro de 1, 2, 3, 4 o 5 segundos.

En ciertas modalidades, la pluma inyectora reutilizable o el dispositivo de administración autoinyector es útil para la inyección de cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en el presente documento con una fuerza del resorte de 10N a 100N. En ciertas modalidades, la pluma inyectora reutilizable o el dispositivo de administración autoinyector es útil para la inyección de cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en el presente documento con una fuerza del resorte de 10N a 50N. En ciertas modalidades, la pluma inyectora reutilizable o el dispositivo de administración autoinyector es útil para la inyección de cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en el presente documento con

una fuerza del resorte entre 10N, 20N, 30N, 40N, 50N, 60N, 70N, 80N, 90N o 100N. En ciertas modalidades, la pluma inyectora reutilizable o el dispositivo de administración autoinyector es útil para la inyección de cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en el presente documento con una fuerza del resorte entre aproximadamente 10N, 20N, 30N, 40N, 50N, 60N, 70N, 80N, 90N o 100N. En ciertas modalidades, la pluma inyectora reutilizable o el dispositivo de administración autoinyector es útil para la inyección de cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en el presente documento con una fuerza del resorte de aproximadamente 50N.

En ciertas modalidades, la pluma inyectora reutilizable o el dispositivo de administración autoinyector permite la inyección de cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en el presente documento con una fuerza de extrusión de 1N a 10N. En ciertas modalidades, la pluma inyectora reutilizable o el dispositivo de administración autoinyector permite la inyección de cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en el presente documento con una fuerza de extrusión de 1N, 2N, 3N, 4N, 5N, 6N, 7N, 8N, 9N o 10N. En ciertas modalidades, la pluma inyectora reutilizable o el dispositivo de administración autoinyector permite la inyección de cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en el presente documento con una fuerza de extrusión de aproximadamente 1N, 2N, 3N, 4N, 5N, 6N, 7N, 8N, 9N o 10N. En ciertas modalidades, la pluma inyectora reutilizable o el dispositivo de administración autoinyector permite la inyección de cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en el presente documento con una fuerza de extrusión de aproximadamente 6N.

EJEMPLOS

La presente divulgación, que se describe de manera general, se comprenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, los cuales se incluyen únicamente con fines de ilustrar ciertas modalidades de la presente divulgación y no se pretende que limiten su alcance.

Los significados de las abreviaturas en los ejemplos se muestran a continuación.

CHO = ovario de hámster chino

SDS PAGE = electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

HMW = especies de alto peso molecular

LMW = especies de bajo peso molecular

PS80 = Polisorbato-80

DTPA = pentaacetato de dietilentriamina

EDTA = ácido etilendiaminotetraacético

MFI = intensidad media de fluorescencia

UPSEC = cromatografía de exclusión por tamaño de ultra alto rendimiento

cIEF = enfoque isoeléctrico capilar

CE-SDS = electroforesis capilar de dodecil sulfato de sodio

Fc = región cristalizable del fragmento

IgG = inmunoglobulina G

P188 = Poloxámero-188

Ejemplo: 1 Proteínas de fusión ActRIIA-Fc

Se construyó una proteína de fusión ActRIIA soluble que tiene el dominio extracelular de ActRIIA humano fusionado a un dominio Fc humano o de ratón con un enlazador mínimo en el medio. Las construcciones se denominan ActRIIA-hFc y ActRIIA-mFc, respectivamente.

El ActRIIA-hFc que se muestra a continuación también se conoce como Sotatercept y está purificado a partir de líneas celulares CHO (SEQ ID NO: 32):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
CWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVTQPTSNPVTPK
PPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSFGSFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMSHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

Las proteínas ActRIIA-hFc y ActRIIA-mFc se expresaron en líneas celulares CHO. Se consideraron tres secuencias líderes diferentes:

(i) Melitina de abeja (HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 33)

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

(iii) Nativo: MGAAAKLAFVFLISCSSGA (SEQ ID NO: 35).

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

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCY
GDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEG
NMCNEKFSYFPMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK

DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 36)

Esta proteína está codificada por la siguiente secuencia de ácido nucleico:

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCT
 TCGTTTCGCCCCGGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTTTT
 TTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGTAACCGTGT
 ATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGG
 TTCCATTGAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACA
 GGACTGATTGTGTAGAAAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGA
 GGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCGGAGATGGAAGTCACACAG
 CCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGGAACTCACACAT
 GCCCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC
 CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGT
 GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA
 CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA
 GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG
 CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGTCCCCATCGAGAA
 AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC
 CCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
 AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA
 GAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC
 TATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA
 TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
 TGTCTCCGGGTAAATGAGAATTC (SEQ ID NO: 37)

Tanto ActRIIA-hFc como ActRIIA-mFc fueron notablemente susceptibles a la expresión recombinante. Como se muestra en las Figuras 2A y 2B, la proteína se purificó como un único pico de proteína bien definido. La secuenciación N-terminal reveló una única secuencia de –ILGRSETQE (SEQ ID NO: 38). La purificación se puede lograr mediante una serie de pasos de cromatografía en columna, incluidos, por ejemplo, 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 tampón. La proteína ActRIIA-hFc se purificó hasta una pureza de >98 % según lo determinado por cromatografía de exclusión por tamaño y >95 % según lo determinado por SDS PAGE.

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 amina. Las proteínas ActRIIA-hFc y ActRIIA-mFc se cargaron en el sistema y se midió la unión. ActRIIA-hFc se unió a activina con una constante de disociación (K_D) de 5×10^{-12} y se unió a GDF11 con una K_D de $9,96 \times 10^{-9}$. Véase Figuras 3A y 3B. 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, por ejemplo, activina B, GDF8, BMP6 y BMP10, ActRIIA-mFc se comportó de manera similar.

El ActRIIA-hFc fue muy estable en estudios farmacocinéticos. A las ratas se les administraron dosis de 1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg de proteína ActRIIA-hFc y se midieron los niveles plasmáticos de la proteína a las 24, 48, 72, 144 y 168 horas. En un estudio separado, se administró a las ratas 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 elevados 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 los monos *cynomolgus*, la vida media plasmática fue sustancialmente mayor a 14 días y los niveles circulantes del fármaco fueron 25 µg/ml, 304 µg/ml o 1440 µg/ml para administraciones iniciales de 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg, respectivamente.

Ejemplo 2: Caracterización de una proteína ActRIIA-hFc

La proteína de fusión ActRIIA-hFc se expresó en células CHO-DUKX B11 transfectadas de forma estable a partir de un vector pAID4 (ori/potenciador SV40, promotor CMV), utilizando una secuencia líder del plasminógeno tisular de SEQ ID NO: 34. La proteína, purificada como se describe anteriormente en el Ejemplo 1, tenía una secuencia de 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 ActRIIA-hFc se forma como un homodímero con enlaces disulfuro.

El material expresado en células CHO tiene una mayor afinidad por el ligando de activina B que la informada para una proteína de fusión ActRIIA-hFc expresada en células 293 humanas (véase, 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 altamente pura. El uso de la secuencia líder nativa dio como resultado dos especies principales de ActRIIA-Fc, cada una con una secuencia N-terminal diferente.

Trampas de ligando ActRIIA adicionales (proteínas de fusión ActRIIA-Fc modificadas para reducir la relación de unión de activina A con respecto a miostatina o GDF11) se describen en las publicaciones de solicitudes de patente internacionales números WO 2006/012627 y WO 2007/062188, incorporadas por referencia en el presente documento.

Ejemplo 3: Preparación de una formulación líquida de proteína de fusión ActRIIA-hFc

Inicialmente, la proteína de fusión ActRIIA-hFc Sotatercept (SEQ ID NO: 32) se formuló en solución salina tamponada con fosfato como una solución congelada. Con base en estudios de desarrollo adicionales, se desarrolló una formulación de tampón de citrato liofilizado de la proteína de fusión ActRIIA-hFc Sotatercept que contiene sacarosa y Polisorbato-80, para permitir una formulación estable con una vida útil adecuada para su comercialización. La formulación liofilizada consiste en una torta liofilizada de Sotatercept (45 mg/vial o 60 mg/vial) como parte de un kit de inyección que también contiene un adaptador de vial, una jeringa precargada de agua estéril para inyección, una jeringa de inyección, una aguja de inyección e hisopos con alcohol. Sin embargo, a los usuarios no les gustó la necesidad de reconstituir la torta liofilizada antes de su administración. Para mejorar la experiencia del usuario, se formuló una formulación líquida que comprende Sotatercept, adecuada para una combinación de jeringa precargada y/o dispositivo autoinyector, a la luz de los siguientes experimentos.

Estudios de viabilidad de líquidos de concentración

Se realizó un estudio de estabilidad de concentración para evaluar la estabilidad biofísica a corto plazo de Sotatercept (SEQ ID NO: 32) en varias concentraciones. Se prepararon formulaciones que comprendían 100 mg/ml y 50 mg/ml de Sotatercept en tampón de citrato 10 mM y 8 % (peso/volumen) de sacarosa a pH 5,8. La Tabla 1 muestra la estabilidad de la formulación que contiene 100 mg/ml de Sotatercept. La formulación que contiene 100 mg/ml de Sotatercept se preparó a diferentes temperaturas (5 °C, 25 °C y 40 °C) y se analizaron puntos de tiempo seleccionados para demostrar que la formulación en tampón de citrato y sacarosa tuvo un cambio mínimo en la formación de alto peso molecular (medido por UPSEC) y la distribución de carga (medida por cIEF) a 5 °C y 25 °C.

Tabla 1: Viabilidad y estabilidad del Sotatercept en alta concentración (10 mM de citrato, pH 5,8)						
Ensayo	100 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de citrato, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 5,8					
	Inicial	5 °C		25 °C		40 °C
		3 M	5 M	3 M	5 M	1 M
UP-SEC						
% HMW	0,9	1,0	1,0	1,5	1,6	1,9
% Monómero	98,6	98,5	98,5	97,5	97,1	96,8
% LMW	0,5	0,5	0,5	1,0	1,2	1,3
cIEF						
% Ácido	18,122	27,992	NT	28,004	NT	19,083
% Principal 1	40,882	31,976	NT	30,222	NT	32,921
% Principal 2	30,415	35,064	NT	33,402	NT	28,550
% Básico	10,583	4,968	NT	8,372	NT	19,447

Las Tablas 2 y 3 muestran la estabilidad de la formulación que contiene 50 mg/ml de Sotatercept. La formulación que contiene 50 mg/ml de Sotatercept se preparó a diferentes temperaturas (5 °C, 25 °C y 40 °C) y se analizaron puntos de tiempo seleccionados para demostrar que la formulación en tampón de citrato, sacarosa, PS80 y con o sin DTPA, tiene un cambio mínimo en la formación de partículas subvisibles (medida por MFI), formación de alto peso molecular (medida por UPSEC), distribución de carga (medida por cIEF) y fragmentación (medida por CE-SDS) a 5 °C y 25 °C.

Tabla 2: Estabilidad a largo plazo de la formulación líquida de Sotatercept (10 mM de citrato, pH 5,8)												
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de citrato, 8 % (peso/volumen), sacarosa, 0,02 % (peso/volumen) PS-80, pH 5,8											
	Inicial	5 °C						25 °C		40 °C		
		1 M	3 M	6 M	12 M	18 M	24 M	3 M	6 M	18 M	1 M	3 M
pH	6,1	5,9	6,0	NT	NT	NT	NT	6,0	NT	NT	6,0	6,0
UP-SEC												
% HMW	0,6	0,6	0,7	NT	NT	0,8	0,9	0,9	1,0	1,4	1,1	1,6
% Monómero	98,9	98,8	98,7	NT	NT	98,5	97,2	98,1	97,5	95,1	97,4	95,1
% LMW	0,6	0,6	0,6	NT	NT	0,7	1,9	0,9	0,4	3,5	1,5	3,3
cIEF												
% Ácido	19,0	21,3	19,2	NT	NT	19,1	21,4	20,8	20,5	21,0	17,5	22,5
% Principal 1	27,8	28,8	28,3	NT	NT	40,9	41,0	30,3	35,3	29,4	25,3	37,5
% Principal 2	37,2	36,3	38,5	NT	NT	28,3	27,8	32,7	29,3	26,2	34,3	15,6
% Básico	16,1	13,6	14,0	NT	NT	11,7	9,9	16,3	14,9	23,4	22,9	24,4
CE-SDS (NR)												
% IgG principal	97,3	96,6	NT	NT	NT	98,2	98,1	NT	96,4	94,9	96,1	NT
% LMW	2,5	3,0	NT	NT	NT	1,8	1,9	NT	3,1	5,1	3,5	NT
MFI												
≥10 µm/ml	123	40	23	NT	NT	NT	NT	33	NT	NT	35	5
≥25 µm/ml	3	0	3	NT	NT	NT	NT	0	NT	NT	0	3

Tabla 3: Estabilidad a largo plazo de la formulación líquida de Sotatercept (10 mM de citrato, pH 5,8)										
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de citrato, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, 0,02 % (peso/volumen) de PS-80, 50 µM de DTPA, pH 5,8									
	Inicial	5 °C				25 °C		40 °C		
		1 M	3 M	6 M	12 M	3 M	6 M	1 M	3 M	
pH	6,1	5,9	6,0	NT	NT	6,0		5,9	5,9	
UP-SEC										
% HMW	0,6	0,6	0,7	NT	0,8	0,9	1,0	1,1	1,6	
% Monómero	98,9	98,8	98,8	NT	98,6	98,1	97,3	97,4	95,0	
% LMW	0,6	0,6	0,6	NT	0,6	1,0	0,5	1,5	3,4	
cIEF										
% Ácido	18,5	20,7	20,1	NT	NT	19,8	20,8	21,4	24,7	
% Principal 1	27,7	30,5	28,4	NT	NT	30,2	36,2	26,8	36,8	
% Principal 2	37,7	34,9	38,0	NT	NT	33,2	29,8	30,9	15,3	
% Básico	16,2	13,9	13,5	NT	NT	16,9	13,3	20,9	23,3	
CE-SDS (NR)										
% IgG principal	97,9	96,9	NT	NT	NT	NT	96,6	96,6	NT	
% LMW	2,0	2,3	NT	NT	NT	NT	3,0	2,8	NT	
MFI										
≥10 µm/ml	83	20	15	NT	7	13	NT	18	23	
≥25 µm/ml	8	0	0	NT	0	5	NT	3	0	

Estudios de viabilidad de pH y tampones

Se analizó el comportamiento de Sotatercept (SEQ ID NO: 32) en 6 tampones a diferentes pH y 8 % de sacarosa. Los tampones probados fueron histidina a pH 6,5 y 7; fosfato a pH 5, 5,5, 6, 6,5 y 7; citrato a pH 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5 y 7; acetato a pH 4,5, 5, 5,5 y 6;

succinato 4,5 y 5; y glutamato a pH 4,5 y 5. Los resultados se muestran en las Tablas 4 a 13. Las formulaciones se sometieron a estrés térmico a 40 °C hasta dos meses y se probaron para determinar la estabilidad biofísica (turbidez), la formación de partículas subvisibles (medida por MFI), la formación de alto peso molecular (a través de UPSEC), la fragmentación (a través de R-CESDS y NR-CESDS) y la distribución de carga (a través de cIEF).

Tabla 4: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (10 mM de histidina)						
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de histidina, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 6,5-7,0					
	pH 6,5			pH 7,0		
	Inicial	40 °C		Inicial	40 °C	
		1 M	2 M		1 M	2 M
Conc. (mg/ml)	47,25	47,52	47,26	47,25	47,33	46,77
pH	6,02	6,26	6,21	6,25	6,52	6,46
Turbidez $A_{350-500}$	0,126	0,169	0,203	0,125	0,171	0,206
UP-SEC						
% HMW	0,6	0,9	1,0	0,6	0,8	1,0
% Monómero	98,9	97,6	96,5	98,9	97,6	96,3
% LMW	0,1	0,5	0,8	0,1	0,5	0,8
cIEF						
% Ácido	22,241	22,014	21,063	21,474	23,526	24,243
% Principal 1	39,017	31,914	29,056	35,865	32,761	28,640
% Principal 2	31,467	28,571	27,758	29,061	30,525	29,344
% Básico	7,275	17,501	22,124	13,599	13,188	17,772
CE-SDS (NR)						
% IgG principal	NT	NT	95,261	NT	NT	NT
% LMW	NT	NT	4,505	NT	NT	NT
CE-SDS (R)						
% Pureza total	NT	NT	94,280	NT	NT	NT
% Impureza	NT	NT	5,720	NT	NT	NT
MFI						
≥10 $\mu\text{m/ml}$	3	60	19	10	14	7
≥25 $\mu\text{m/ml}$	0	14	7	0	3	0

Tabla 5: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (10 mM de histidina)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de histidina, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 5,0-6,0								
	pH 5,0			pH 5,5			pH 6,0		
	Inicial	40 °C		Inicial	40 °C		Inicial	40 °C	
		1 M	2 M		1 M	2 M		1 M	2 M
Conc. (mg/ml)	46,16	46,21	47,17	47,45	47,25	47,51	46,33	47,35	47,59
pH	5,17	5,47	5,41	5,41	5,69	5,62	5,65	6,17	5,94
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,138	0,167	0,207	0,133	0,167	0,204	0,128	0,134	0,203
UP-SEC									
% HMW	0,6	1,5	2,2	0,6	1,1	1,7	0,6	1,0	1,2
% Monómero	98,8	97,5	96,0	98,9	97,8	96,6	98,9	97,8	96,8
% LMW	0,1	0,7	1,3	0,1	0,7	1,1	0,1	0,6	0,9
cIEF									
% Ácido	21,621	14,210	11,335	22,478	16,483	14,072	22,663	18,935	17,487
% Principal 1	39,432	28,156	23,975	38,506	30,466	25,766	38,368	32,272	28,854
% Principal 2	30,669	21,287	18,277	31,556	24,300	21,370	31,139	26,521	23,999
% Básico	8,278	36,348	46,413	7,460	28,751	38,792	7,830	22,272	29,660
CE-SDS (NR)									
% IgG principal	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	95,102
% LMW	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	4,606
CE-SDS (R)									
% Pureza total	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	88,787
% Impureza	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	11,213
MFI									
≥10 µm/ml	30	324	49	26	40	26	17	26	10
≥25 µm/ml	0	44	5	0	12	10	0	10	5

Tabla 6: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (10 mM de fosfato)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de fosfato, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 5,0 - 6,0								
	pH 5,0			pH 5,5			pH 6,0		
	Inicial	40 °C		Inicial	40 °C		Inicial	40 °C	
		1 M	2 M		1 M	2 M		1 M	2 M
Conc. (mg/ml)	46,59	47,01	47,40	47,40	47,60	48,76	48,22	47,81	49,07
pH	5,51	5,90	5,83	5,66	5,90	5,84	5,85	6,05	6,04
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,134	0,138	0,147	0,131	0,139	0,144	0,131	0,141	0,142
UP-SEC									
% HMW	0,6	1,1	1,6	0,6	1,1	1,5	0,6	1,1	1,3
% Monómero	98,8	97,7	96,6	98,8	97,6	96,4	98,8	97,5	96,3
% LMW	0,1	0,5	0,9	0,1	0,5	0,9	0,1	0,5	0,8
cIEF									
% Ácido	21,970	19,304	17,829	21,842	20,225	19,274	21,728	21,044	20,631
% Principal 1	38,962	32,517	29,980	39,569	32,472	29,516	39,110	31,535	29,784
% Principal 2	31,097	27,007	25,058	30,953	27,557	26,688	30,675	27,772	27,663
% Básico	7,971	21,172	27,133	7,636	19,746	24,522	8,487	19,649	21,923
CE-SDS (NR)									
% IgG principal	NT	NT	94,922	NT	NT	95,285	NT	NT	95,043
% LMW	NT	NT	4,695	NT	NT	4,360	NT	NT	4,568
CE-SDS (R)									
% Pureza total	NT	NT	88,965	NT	NT	89,071	NT	NT	93,886
% Impureza	NT	NT	11,035	NT	NT	10,929	NT	NT	6,114
MFI									
≥10 µm/ml	37	23	30	10	10	21	23	33	17
≥25 µm/ml	5	3	3	0	0	0	0	3	0

Tabla 7: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (10 mM de fosfato)						
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en fosfato 10 mM, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 6,5-7,0					
	pH 6,5			7,0		
	Inicial	40 °C		Inicial	40 °C	
		1 M	2 M		1 M	2 M
Conc. (mg/ml)	47,02	47,75	47,45	47,91	48,50	24,04
pH	6,27	6,42	6,44	6,78	6,96	6,86
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,130	0,136	0,138	0,130	0,138	0,145
UP-SEC						
% HMW	0,7	1,0	1,2	0,7	1,1	1,3
% Monómero	98,8	97,2	95,8	98,7	96,5	94,4
% LMW	0,1	0,5	0,9	0,1	0,6	1,2
cIEF						
% Ácido	21,743	24,243	26,137	22,782	29,561	35,024
% Principal 1	39,014	33,323	28,442	37,878	29,693	22,660
% Principal 2	31,010	30,987	30,661	31,624	32,983	31,191
% Básico	8,233	11,447	14,760	7,717	7,763	11,124
CE-SDS (NR)						
% IgG principal	NT	NT	95,031	NT	NT	93,447
% LMW	NT	NT	4,703	NT	NT	6,286
CE-SDS (R)						
% Pureza total	NT	NT	93,750	NT	NT	93,739
% Impureza	NT	NT	6,250	NT	NT	6,261
MFI						
≥10 µm	35	14	5	17	5	10
≥25 µm	0	3	0	0	0	0

Tabla 8: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (10 mM de citrato)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de citrato, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 4,5-5,5								
	pH 4,5			pH 5,0			pH 5,5		
	Inicial	40 °C		Inicial	40 °C		Inicial	40 °C	
		1 M	2 M		1 M	2 M		1 M	2 M
Conc. (mg/ml)	44,58	46,18	46,03	46,68	46,92	46,27	47,20	47,44	46,77
pH	4,69	4,92	4,86	5,22	5,43	5,39	5,61	5,75	5,578
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,144	0,157	0,187	0,135	0,144	0,169	0,133	0,139	0,150
UP-SEC									
% HMW	0,8	2,3	3,6	0,6	1,4	1,9	0,6	1,0	1,3
% Monómero	98,6	96,1	94,0	98,8	97,5	96,9	98,9	97,7	96,8
% LMW	0,1	1,4	2,1	0,1	0,8	0,8	0,1	0,6	0,9
cIEF									
% Ácido	21,107	12,360	12,220	21,969	16,280	15,834	21,830	20,637	20,773
% Principal 1	39,835	22,544	19,517	39,136	28,539	22,747	39,464	32,118	28,193
% Principal 2	30,278	16,429	15,006	31,203	21,377	19,649	31,018	26,108	25,434
% Básico	8,780	48,666	53,258	7,691	33,804	41,771	7,688	21,137	25,600
CE-SDS (NR)									
% IgG principal	NT	NT	88,219	NT	NT	92,980	NT	NT	94,994
% LMW	NT	NT	10,633	NT	NT	6,385	NT	NT	4,554
CE-SDS (R)									
% Pureza total	NT	NT	70,912	NT	NT	87,825	NT	NT	91,937
% Impureza	NT	NT	29,088	NT	NT	12,175	NT	NT	8,063
MFI									
≥10 µm/ml	21	543	86	12	12	240	3	7	23
≥25 µm/ml	0	95	12	0	3	35	0	3	3

Tabla 9: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (10 mM de citrato)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de citrato, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 6,0-7,0								
	pH 6,0			pH 6,5			pH 7,0		
	Inicial	40 °C		Inicial	40 °C		Inicial	40 °C	
		1 M	2 M		1 M	2 M		1 M	2 M
Conc. (mg/ml)	47,63	47,39		47,13	47,16		46,68	47,49	
pH	6,02	6,18	6,33	6,40	6,58	6,48	6,75	6,82	6,78
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,132	0,137	0,144	0,132	0,135	0,148	0,131	0,138	0,144
UP-SEC									
% HMW	0,6	1,0	1,2	0,6	1,0	1,2	0,7	1,0	1,2
% Monómero	98,8	97,4	96,3	98,8	97,1	95,6	98,8	96,7	94,9
% LMW	0,1	0,5	0,8	0,1	0,5	0,9	0,1	0,6	1,1
cIEF									
% Ácido	22,162	22,456	23,907	22,169	25,026	26,032	22,573	26,621	28,835
% Principal 1	38,877	33,294	29,372	38,835	33,435	29,029	38,999	31,168	36,971
% Principal 2	30,866	29,083	28,956	31,198	31,578	30,237	31,295	31,235	31,792
% Básico	8,096	15,168	17,764	7,799	9,961	14,702	7,133	10,975	12,401
CE-SDS (NR)									
% IgG principal	NT	NT	95,222	NT	NT	94,990	NT	NT	94,443
% LMW	NT	NT	4,453	NT	NT	4,634	NT	NT	5,164
CE-SDS (R)									
% Pureza total	NT	NT	93,311	NT	NT	93,456	NT	NT	91,462
% Impureza	NT	NT	6,689	NT	NT	6,544	NT	NT	8,538
MFI									
≥10 µm/ml	39	13,77	13,77	6,88	13,80	22,96	0	2,3	9,18
≥25 µm/ml	2,29	4,59	2,29	0	2,3	2,3	0	0	0

Tabla 10: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (10 mM de acetato)						
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de acetato, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 4,5-5,0					
	pH 4,5			5,0		
	Inicial	40 °C		Inicial	40 °C	
		1 M	2 M		1 M	2 M
Conc. (mg/ml)	49,11	46,44		46,54	46,53	
pH	4,99	5,22	5,35	5,2	5,54	5,42
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,140	0,152	0,170	0,138	0,148	0,162
UP-SEC						
% HMW	0,7	1,8	2,6	0,6	1,6	2,1
% Monómero	98,8	97,1	95,7	98,8	97,4	96,1
% LMW	0,1	0,8	1,3	0,1	0,7	1,2
cIEF						
% Ácido	21,973	1,313	10,281	21,408	14,768	12,455
% Principal 1	30,705	28,696	24,651	39,580	29,774	26,364
% Principal 2	39,136	20,926	17,676	31,233	22,475	19,721
% Básico	8,186	37,064	47,392	7,779	32,983	41,46
CE-SDS (NR)						
% IgG principal	NT	NT	NT	NT	NT	NT
% LMW	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CE-SDS (R)						
% Pureza total	NT	NT	NT	NT	NT	NT
% Impureza	NT	NT	NT	NT	NT	NT
MFI						
≥10 µm	6,88	108,01	20,66	4,59	71,16	11,48
≥25 µm	0	2,3	2,3	0	16,07	0

Tabla 11: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (10 mM de acetato)						
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de acetato, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 5,5-6,0					
	pH 5,5			6,0		
	Inicial	40 °C		Inicial	40 °C	
		1 M	2 M		1 M	2 M
Conc. (mg/ml)	46,38	47,27		46,75	47,76	
pH	5,65	5,88	5,87	5,83	6,06	6,11
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,125	0,138	0,144	0,131	0,143	0,142
UP-SEC						
% HMW	0,6	1,1	1,4	0,6	1,1	1,3
% Monómero	98,8	97,5	96,5	98,8	97,5	96,4
% LMW	0,1	0,5	0,8	0,1	0,5	0,8
cIEF						
% Ácido	22,335	19,428	12,455	22,071	21,524	19,201
% Principal 1	38,859	32,583	26,364	38,083	28,718	29,914
% Principal 2	30,964	27,144	19,721	30,880	13,701	26,851
% Básico	7,841	20,845	41,460	8,967	16,557	24,460
CE-SDS (NR)						
% IgG principal	NT	NT	NT	NT	NT	NT
% LMW	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CE-SDS (R)						
% Pureza total	NT	NT	NT	NT	NT	NT
% Impureza	NT	NT	NT	NT	NT	NT
MFI						
≥10 µm	16,05	9,18	4,59	9,17	6,88	323,85
≥25 µm	0	2,3	2,29	0	0	43,64

Tabla 12: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (10 mM de succinato)						
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de succinato, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 4,5-5,0					
	pH 4,5			5,0		
	Inicial	40 °C		Inicial	40 °C	
		1 M	2 M		1 M	2 M
Conc. (mg/ml)	46,82	46,50		46,64	47,07	
pH	4,78	4,81	4,93	5,07	5,37	5,24
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,156	0,170	0,197	0,144	0,155	0,169
UP-SEC						
% HMW	0,9	2,7	4,3	0,7	1,7	2,5
% Monómero	98,5	95,6	93,2	98,8	97,1	95,7
% LMW	0,1	1,4	2,2	0,1	1,0	1,8
cIEF						
% Ácido	21,744	10,27	8,657	22,063	13,924	11,501
% Principal 1	38,603	22,619	18,535	38,475	27,277	23,057
% Principal 2	30,973	16,061	14,024	30,983	20,148	17,682
% Básico	8,68	51,050	58,785	8,48	38,651	47,761
CE-SDS (NR)						
% IgG principal	NT	NT	87,101	NT	NT	91,657
% LMW	NT	NT	11,070	NT	NT	7,199
CE-SDS (R)						
% Pureza total	NT	NT	72,618	NT	NT	82,578
% Impureza	NT	NT	27,382	NT	NT	17,428
MFI						
≥10 µm	27,53	78,09	6,88	9,17	66,57	78,09
≥25 µm	2,29	11,48	0	0	2,3	11,48

Tabla 13: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (10 mM de glutamato)						
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de glutamato, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 4,5-5,0					
	pH 4,5			5,0		
	Inicial	40 °C		Inicial	40 °C	
		1 M	2 M		1 M	2 M
Conc. (mg/ml)	46,65	46,85	46,93	47,55	47,18	47,40
pH	4,99	5,11	5,27	5,47	5,8	5,68
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,149	0,167	0,195	0,138	0,150	0,162
UP-SEC						
% HMW	0,7	1,9	2,8	0,6	1,3	1,7
% Monómero	98,7	97,1	95,2	98,8	97,5	96,1
% LMW	0,1	1,0	1,9	0,1	0,6	1,1
cIEF						
% Ácido	22,272	13,005	10,482	22,681	18,419	16,988
% Principal 1	38,186	27,182	22,944	38,409	31,751	28,646
% Principal 2	31,174	20,128	16,706	31,259	26,359	24,429
% Básico	8,368	39,684	49,868	7,652	23,470	29,937

Como se muestra en las Tablas 4 a 13 anteriores y en las Figuras 4 a 7, todas las formulaciones exhiben una estabilidad razonable a temperaturas elevadas, lo que sugiere que todos los sistemas de amortiguación probados son factibles para la formulación líquida. De

estos, la histidina fue la menos estable y los demás tampones se comportaron de igual manera.

También se analizó el comportamiento del Sotatercept en tampones 6 a pH 3, 5,8 y 8 y 8 % de sacarosa. Los tampones probados fueron citrato, histidina, succinato, lactato, MES y TRIS. Los resultados se muestran en las Tablas 14 a 30. Las formulaciones se probaron para determinar la estabilidad biofísica (turbidez), la formación de alto peso molecular (a través de UPSEC), la agregación (a través de UPSEC) y la fragmentación (a través de R-CESDS y NR-CESDSUPSEC) y la distribución de carga (a través de cIEF) en el tiempo 0 (T0), 15 días y 30 días.

Tabla 14: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (5 mM de citrato)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 5 mM de citrato, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 3,0-8,0								
	pH 3,0			pH 5,8			pH 8,0		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		2 W	1 M		2 W	1 M		2 W	1 M
Conc. (mg/ml)	51,3	57,5	66,7	54,1	61,4	63,3	53,9	60,2	63,3
pH	3,54	3,74	NT	5,73	5,74	5,74	7,09	7,03	6,27
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,140	0,408	NT	0,148	0,193	0,224	0,154	0,198	0,240
UP-SEC									
% HMW	1,6	83,6	NT	0,9	1,7	NT	1,2	1,8	NT
% Monómero	95,6	11,8	NT	96,4	94,1	NT	95,9	93,1	NT
% LMW	2,7	4,6	NT	2,7	4,2	NT	2,8	5,1	NT

Tabla 15: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (10 mM de citrato)

Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de citrato, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 3,0-8,0								
	pH 3,0			pH 5,8			pH 8,0		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		2 W	1 M		2 W	1 M		2 W	1 M
Conc. (mg/ml)	54,4	57,6	NT	53,7	62,8	62,8	53,7	62,5	62,8
pH	3,33	3,57	NT	5,8	5,75	5,15	7,28	7,13	6,99
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,149	0,455	NT	0,147	0,196	0,241	0,160	0,219	0,271
UP-SEC									
% HMW	2,4	93,9	NT	0,9	1,6	NT	1,3	2,0	NT
% Monómero	94,6	1,8	NT	96,5	94,4	NT	96,0	92,6	NT
% LMW	2,9	4,3	NT	2,6	4,0	NT	2,6	5,4	NT

Tabla 16: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (50 mM de citrato)

Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 50 mM de citrato, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 5,8-8,0					
	pH 5,8			pH 8,0		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		2 W	1 M		2 W	1 M
Conc. (mg/ml)	47,9	53,2	55,7	51,7	53,8	66,7
pH	5,93	5,96	NT	7,16	7,16	5,85
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,141	0,179	0,248	0,173	0,211	NT
UP-SEC						
% HMW	0,8	1,4	NT	1,3	2,2	NT
% Monómero	96,5	94,5	NT	95,9	90,8	NT
% LMW	2,6	4,1	NT	2,8	7,0	NT

Tabla 17: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (5 mM de succinato)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 5 mM de succinato, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 3,0-8,0								
	pH 3,0			pH 5,8			pH 8,0		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		2 W	1 M		2 W	1 M		2 W	1 M
Conc. (mg/ml)	53,0	57,5	60,3	53,2	59,8	61,4	53,6	60,3	62,6
pH	4,11	4,22	NT	5,71	5,75	2,52	6,82	6,82	5,54
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,155	0,282	0,707	0,145	0,193	0,246	0,148	0,198	0,241
UP-SEC									
% HMW	1,8	42,7	NT	0,9	2,1	NT	1,2	1,7	NT
% Monómero	95,5	50,8	NT	96,6	93,7	NT	96,2	93,4	NT
% LMW	2,7	6,5	NT	2,5	4,1	NT	2,6	4,9	NT

Tabla 18: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (10 mM de succinato)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de succinato, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 3,0-8,0								
	pH 3,0			pH 5,8			pH 8,0		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		2 W	1 M		2 W	1 M		2 W	1 M
Conc. (mg/ml)	49,8	57,8	59,0	54,0	59,2	64,8	53,1	57,0	62,8
pH	2,92	4,04	5,83	5,82	5,84	4,1	6,96	6,94	5,78
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,140	0,320	0,786	0,152	0,192	0,254	0,155	0,193	0,257
UP-SEC									
% HMW	1,6	48,7	NT	0,9	1,8	NT	1,2	1,7	NT
% Monómero	95,6	45,5	NT	96,6	94,0	NT	96,3	93,5	NT
% LMW	2,8	5,8	NT	2,5	4,2	NT	2,5	4,8	NT

Tabla 19: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (50 mM de succinato)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 50 mM de succinato, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 3,0-8,0								
	pH 3,0			pH 5,8			pH 8,0		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		2 W	1 M		2 W	1 M		2 W	1 M
Conc. (mg/ml)	55,8	55,2	NT	54,3	56,7	46,8	54,4	59,6	63,1
pH	3,49	3,64	6,53	5,77	5,78	NT	7,31	7,19	5,21
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,151	0,530	NT	0,155	0,214	0,331	0,168	0,248	0,382
UP-SEC									
% HMW	1,7	77,5	NT	0,9	1,7	NT	1,4	2,4	NT
% Monómero	95,4	17,3	NT	96,6	94,2	NT	96,2	90,8	NT
% LMW	2,8	5,2	NT	2,5	4,1	NT	2,4	6,8	NT

Tabla 20: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (5 mM de histidina)

Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 5 mM de histidina, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 3,0-8,0								
	pH 3,0			pH 5,8			pH 8,0		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		2 W	1 M		2 W	1 M		2 W	1 M
Conc. (mg/ml)	52,4	58,7	61,3	54,9	57,7	65,0	54,2	58,2	NT
pH	4,46	4,64	6,73	5,36	5,44	3,29	6,61	6,62	4,19
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,192	0,311	0,535	0,154	0,237	0,405	0,152	,0220	NT
UP-SEC									
% HMW	1,8	36,3	NT	0,9	8,4	NT	1,8	1,1	NT
% Monómero	95,7	57,9	NT	96,5	87,2	NT	95,6	94,2	NT
% LMW	2,6	5,8	NT	2,6	4,4	NT	2,6	4,6	NT

Tabla 21: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (10 mM de histidina)

Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de histidina, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 3,0-8,0								
	pH 3,0			pH 5,8			pH 8,0		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		2 W	1 M		2 W	1 M		2 W	1 M
Conc. (mg/ml)	52,7	55,3	63,5	51,8	56,9	72,4	53,9	58,8	62,5
pH	4,17	4,33	NT	5,43	5,51	NT	6,61	6,64	NT
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,166	0,298	NT	0,149	0,243	NT	0,150	0,269	0,411
UP-SEC									
% HMW	0,8	50,5	NT	0,8	6,8	NT	0,8	1,3	NT
% Monómero	96,7	47	NT	96,5	87,3	NT	96,7	93,7	NT
% LMW	2,5	2,4	NT	2,6	5,8	NT	2,4	5,0	NT

Tabla 22: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (50 mM de histidina)

Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 50 mM de histidina, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 3,0-8,0								
	pH 3,0			pH 5,8			pH 8,0		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		2 W	1 M		2 W	1 M		2 W	1 M
Conc. (mg/ml)	52,5	59,6	61,5	53,8	58,2	61,5	54,7	57,8	63,6
pH	5,97	4,72	5,45	5,63	5,85	3,93	5,71	7,06	4,61
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,167	0,419	0,833	0,157	0,302	0,539	0,155	0,301	0,535
UP-SEC									
% HMW	1,4	38,4	NT	0,7	2,8	NT	0,8	0,9	NT
% Monómero	96,2	56,0	NT	96,9	92,8	NT	96,7	93,5	NT
% LMW	2,4	5,5	NT	2,4	4,4	NT	2,5	5,6	NT

Tabla 23: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (10 mM de lactato)

Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de lactato, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 5,8-8,0								
	pH 5,8					pH 8,0			

	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		2 W	1 M		2 W	1 M
Conc. (mg/ml)	51,4	60	59,5	53,5	57,5	62,3
pH	8,05	5,87	5,67	5,93	5,95	5,71
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,143	0,179	0,235	0,147	0,182	0,249
UP-SEC						
% HMW	0,9	2	NT	0,9	1,8	NT
% Monómero	96,7	93,2	NT	96,8	93,5	NT
% LMW	2,4	4,8	NT	2,4	4,7	NT

Tabla 24: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (50 mM de lactato)

Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 50 mM de lactato, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 5,8-8,0					
	pH 5,8			pH 8,0		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		2 W	1 M		2 W	1 M
Conc. (mg/ml)	54	58,7	62,3	54,8	64	65,4
pH	7,65	5,83	4,78	5,95	6,06	5,76
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,155	0,197	0,266	0,162	0,205	0,235
UP-SEC						
% HMW	0,9	1,8	NT	0,9	1,7	NT
% Monómero	96,7	94,1	NT	96,7	93,5	NT
% LMW	2,5	4,1	NT	2,4	4,8	NT

Tabla 25: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (5 mM de MES)

Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 5 mM de MES, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 5,8-8,0					
	pH 5,8			pH 8,0		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		2 W	1 M		2 W	1 M
Conc. (mg/ml)	54,4	58,5	63,1	54,1	58,1	62,8
pH	5,59	5,66	5,11	7,34	6,72	4,02
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,153	0,196	0,283	0,150	0,184	0,215
UP-SEC						
% HMW	0,9	3,3	NT	1,0	1,5	NT
% Monómero	96,6	92,5	NT	96,4	94,1	NT
% LMW	2,5	4,2	NT	2,6	4,4	NT

Tabla 26: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (10 mM de MES)

Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de MES, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 5,8-8,0					
	pH 5,8			pH 8,0		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		2 W	1 M		2 W	1 M
Conc. (mg/ml)	53,7	57,3	62,3	53,9	58,0	64,2
pH	5,89	5,64	7,01	5,73	7,06	5,5
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,150	0,194	0,273	0,153	0,190	0,273
UP-SEC						
% HMW	0,9	3,5	NT	1,1	1,6	NT
% Monómero	96,6	92,6	NT	96,5	93,2	NT
% LMW	2,5	4,0	NT	2,4	5,1	NT

Tabla 27: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (50 mM de MES)

Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 50 mM de MES, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 5,8-8,0					
	pH 5,8			pH 8,0		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		2 W	1 M		2 W	1 M
Conc. (mg/ml)	53,5	58,5	63,2	54,9	63,9	63,9
pH	7,57	5,88	7,01	5,86	7,59	4,69
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,154	0,223	0,297	0,166	0,239	0,260
UP-SEC						
% HMW	0,9	2,2	NT	1,2	2,4	NT
% Monómero	96,6	93,5	NT	96,2	91,4	NT
% LMW	2,5	4,3	NT	2,6	6,2	NT

Tabla 28: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (5 mM de Tris)

Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 5 mM de Tris, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 3,0-8,0								
	pH 3,0			pH 5,8			pH 8,0		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		2 W	1 M		2 W	1 M		2 W	1 M
Conc. (mg/ml)	55,2	61,1	64,7	54,3	58,8	63,5	54,2	59,5	64,2
pH	6,98	5,63	6,88	5,60	5,94	4,93	6,57	7,34	5,78
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,154	0,201	0,261	0,150	0,188	0,232	0,156	0,193	0,239
UP-SEC									
% HMW	0,9	2,9	NT	0,9	2,0	NT	1,0	1,4	NT
% Monómero	96,6	92,7	NT	06,6	93,8	NT	96,5	93,2	NT
% LMW	2,5	4,4	NT	2,5	4,2	NT	2,5	5,4	NT

Tabla 29: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (10 mM de Tris)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de Tris, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 3,0-8,0								
	pH 3,0			pH 5,8			pH 8,0		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		2 W	1 M		2 W	1 M		2 W	1 M
Conc. (mg/ml)	54,2	59,6	64,9	53,9	60,4	63,6	55,6	65,0	65,4
pH	5,66	5,62	5,80	5,93	5,87	4,87	5,86	7,64	5,83
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,159	0,200	0,262	0,153	0,194	0,258	0,158	0,220	0,254
UP-SEC									
% HMW	0,9	2,9	NT	0,9	2,0	NT	1,0	1,5	NT
% Monómero	96,7	93,0	NT	96,8	94,1	NT	96,5	92,2	NT
% LMW	2,4	4,2	NT	2,4	3,8	NT	2,5	6,3	NT

Tabla 30: Estabilidad y viabilidad de la formulación líquida de Sotatercept (50 mM de Tris)						
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 50 mM de Tris, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 5,8-8,0					
	pH 5,8			pH 8,0		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		2 W	1 M		2 W	1 M
Conc. (mg/ml)	55,8	61,9	65,0	54,4	60,7	67,0
pH	5,94	5,91	6,02	5,91	8,06	5,48
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,160	0,201	0,243	0,166	0,229	0,348
UP-SEC						
% HMW	0,8	1,7	NT	0,9	1,6	NT
% Monómero	96,7	94,0	NT	96,7	90,8	NT
% LMW	2,5	4,3	NT	2,4	7,7	NT

Con base en los datos presentados en las Tablas 14 a 30, los tampones evaluados tuvieron una estabilidad comparable a pH 5,8 y pH 8,0 en todas las concentraciones de tampón. Sin embargo, a un pH más bajo, hubo una disminución significativa en la estabilidad para todos los tampones probados. Si bien todos los tampones eran comparables, el citrato y el succinato tuvieron un desempeño marginalmente mejor que otros.

Efecto del quelante de metales sobre Sotatercept

Se estudió el efecto del quelante de metales, DTPA, sobre Sotatercept (SEQ ID NO: 32) formulado en tampón de citrato, pH 5,8, mediante perfiles de RMN de 1H, huellas dactilares de RMN 2D y mediciones de RMN de la difusión traduccional de proteínas. Los resultados de los perfiles 1D y la difusión de proteínas se muestran en las Figuras 8 y 9. Se observó un comportamiento idéntico en los espectros de RMN de 1H de la proteína Sotatercept con y sin DTPA (Figura 8), lo que indica que no se pudo detectar ningún efecto directo de la unión u otras interacciones mediante esta técnica. Además, los datos de las mediciones de difusión detectadas por proteínas con y sin DTPA (Figura 9) no mostraron diferencias en el comportamiento, lo que indica que la adición de DTPA no tiene efecto en el comportamiento de Sotatercept.

Estabilidad coloidal y cribado de tensioactivos

Los estudios de estabilidad coloidal para Sotatercept (SEQ ID NO: 32) se llevaron a cabo mediante agitación estresante agitando los viales que contenían Sotatercept en tampón de citrato de 10 mM, 8 % de sacarosa con niveles variables de PS80 y mediante ciclos de congelación-descongelación (un ciclo: congelar el vial a -80 °C y descongelar a temperatura ambiente). Los resultados se muestran en las Figuras 10 a 13. La Figura 10 muestra el porcentaje de especies de alto peso molecular (% de HMW) detectadas en viales que contienen Sotatercept en tampón de citrato de 10 mM, 8 % con sacarosa con 0 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,03 % y 0,05 % de PS80, agitados durante 3 y 7 días. La Figura 11 muestra el % de HMW detectado en viales que contienen Sotatercept en tampón de citrato de 10 mM, 8 % de sacarosa con 0 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,03 % y 0,05 % de PS80, que se han sometido a tres, cinco y ocho ciclos de congelación-descongelación. Las Figuras 12 y 13 muestran el % de monómero (Figura 12) y el % de HMW (Figura 13) detectados en viales que contienen Sotatercept en tampón de citrato de 10 mM, 8 % de sacarosa con 0 %, 0,01 %, 0,02 % y 0,03 % de PS80, que se han sometido a tres, cinco y ocho ciclos de congelación-descongelación. No se observó ningún cambio en el % de HMW ni en la formación de partículas subvisibles después de siete días de agitación u 8 ciclos de congelación/descongelación. Además, se realizó una comparación directa del Polisorbato-80 y el Poloxámero-188 (1-Mo/25 °C). Los resultados muestran que la molécula es estable frente al estrés por agitación y que no hay diferencia entre el PS80 y el P188, ya que ambos se comportan de forma similar. Todos los atributos analíticos fueron comparables después de un estrés de 1 Mo a 25 °C en la estabilidad del prototipo.

Los resultados de estudios adicionales de estabilidad del tensioactivo se muestran en las Tablas 31 a 35. Los estudios de estabilidad que se muestran en las Tablas 31 a 35 se llevaron a cabo mediante agitación intensa agitando viales que contenían Sotatercept en tampón de citrato de 10 mM y 8 % de sacarosa con niveles variables de tensioactivos. Los tensioactivos cribados fueron Poloxámero-188, dodecil sulfato de sodio (SDS), N-dodecil- β -D-maltósido (DDM), Polisorbato-20 y Triton X a 0,02 mg/ml, 0,2 mg/ml y 2 mg/ml durante 4 días y 7 días. La Tabla 36 muestra los resultados de los estudios de estabilidad para el control de Sotatercept en tampón de citrato de 10 mM y 8 % de sacarosa y sin tensioactivo.

Tabla 31: Cribado del tensioactivo Sotatercept (N-dodecil- β -D-maltósido en citrato)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en DDM, 10 mM de citrato, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 5,8								
	2 mg/ml de DDM			0,2 mg/ml de DDM			0,02 mg/ml de DDM		
	Sin control de agitación	Agitación a TA		Sin control de agitación	Agitación a TA		Sin control de agitación	Agitación a TA	
		4 d	7 d		4 d	7 d		4 d	7 d
Conc. (mg/ml)	NT	NT	NT	52,62	55,51	56,68	54,53	56,64	52,81
pH	5,23	6,01	4,58	5,10	5,80	4,50	5,23	5,78	5,38
Turbidez $A_{350-500}$	NT	NT	NT	0,200	0,230	0,230	0,220	0,240	0,170
UP-SEC									
% HMW	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,5	1,4	1,4	1,4
% Monómero	93,1	93,2	93,1	93,1	93,2	93,1	93,1	93,2	93,2
% LMW	5,5	5,4	5,5	5,4	5,3	5,4	5,5	5,3	5,4
cIEF									
% Ácido	14,1	13,6	13,8	14,0	13,9	14,0	14,1	14,2	14,2
% Principal 1	46,0	46,7	46,6	45,7	46,1	46,4	45,8	46,2	46,3
% Principal 2	27,1	27,2	27,0	27,1	27,2	27,0	27,3	27,0	27,0
% Básico	12,8	12,5	12,6	13,2	12,8	12,5	12,8	12,6	12,5

Tabla 32: Cribado del tensioactivo Sotatercept (Poloxámero-188 en citrato)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en P-188, 10 mM de citrato, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 5,8								
	2 mg/ml de P-188			0,2 mg/ml de P-188			0,02 mg/ml de P-188		
	Sin control de agitación	Agitación a TA		Sin control de agitación	Agitación a TA		Sin control de agitación	Agitación a TA	
		4 d	7 d		4 d	7 d		4 d	7 d
Conc. (mg/ml)	55,48	54,63	52,65	56,25	53,13	53,90	52,90	55,60	56,51
pH	5,69	5,94	4,16	5,32	6,15	4,72	5,00	6,31	5,65
Turbidez $A_{350-500}$	0,200	0,260	0,215	0,215	0,235	0,205	0,200	0,235	0,175
UP-SEC									
% HMW	1,4	1,4	1,4	1,6	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
% Monómero	93,1	93,2	93,1	93,0	93,3	93,1	93,2	93,3	93,2
% LMW	5,4	5,4	5,5	5,5	5,3	5,5	5,4	5,3	5,4
cIEF									
% Ácido	13,9	13,9	13,8	13,9	14,4	14,4	14,0	14,5	14,4
% Principal 1	46,3	46,5	46,5	46,6	45,8	46,0	46,0	46,0	46,2
% Principal 2	27,1	27,1	26,9	27,0	26,7	26,5	27,3	26,9	27,0
% Básico	12,7	12,5	12,8	12,5	13,2	13,0	12,7	12,5	12,5

Tabla 33: Cribado del tensioactivo Sotatercept (Polisorbato-20 en citrato)

Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en PS-20, 10 mM de citrato, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 5,8								
	2 mg/ml de PS-20			0,2 mg/ml de PS-20			0,02 mg/ml de PS-20		
	Sin control de agitación	Agitación a TA		Sin control de agitación	Agitación a TA		Sin control de agitación	Agitación a TA	
		4 d	7 d		4 d	7 d		4 d	7 d
Conc. (mg/ml)	54,93	54,09	52,07	55,33	54,80	53,15	52,54	55,42	55,24
pH	5,70	5,66	4,48	5,28	5,80	4,67	5,49	6,31	4,00
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,155	0,175	0,130	0,180	0,170	0,175	0,185	0,235	0,175
UP-SEC									
% HMW	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
% Monómero	93,1	93,2	93,1	93,2	93,3	93,1	93,2	93,3	93,2
% LMW	5,4	5,4	5,5	5,4	5,3	5,5	5,4	5,3	5,4
cIEF									
% Ácido	14,1	13,8	14,1	14,5	14,1	14,5	14,0	13,7	14,2
% Principal 1	46,2	46,6	46,1	46,0	46,1	46,0	45,9	46,9	45,9
% Principal 2	27,1	26,9	26,9	26,7	27,1	26,6	26,9	27,1	27,0
% Básico	12,6	12,6	12,9	12,8	12,7	12,8	13,2	12,3	13,0

Tabla 34: Cribado del tensioactivo Sotatercept (dodecilsulfato de sodio en citrato)

Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en SDS, 10 mM de citrato, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 5,8								
	2 mg/ml de SDS			0,2 mg/ml de SDS			0,02 mg/ml de SDS		
	Sin control de agitación	Agitación a TA		Sin control de agitación	Agitación a TA		Sin control de agitación	Agitación a TA	
		4 d	7 d		4 d	7 d		4 d	7 d
Conc. (mg/ml)	51,58	52,61	53,02	56,30	53,01	54,72	53,48	55,79	53,96
pH	5,85	NT	4,88	5,63	NT	5,60	5,75	6,31	5,87
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,205	0,245	0,200	0,180	0,240	0,185	0,155	0,225	0,185
UP-SEC									
% HMW	4,9	1,9	2,6	1,7	1,7	1,7	1,4	1,4	1,4
% Monómero	89,4	92,7	91,6	92,8	92,9	92,8	93,2	93,2	93,2
% LMW	5,7	5,4	5,7	5,5	5,4	5,5	5,4	5,4	5,4
cIEF									
% Ácido	13,7	14,0	13,7	14,0	13,8	13,7	14,2	14,1	14,0
% Principal 1	45,6	46,5	47,1	46,1	46,8	46,8	45,5	46,2	46,2
% Principal 2	26,1	26,9	26,3	27,3	27,0	26,7	27,0	27,1	27,0
% Básico	14,6	12,5	13,0	12,6	12,4	12,8	13,3	12,7	12,8

Tabla 35: Cribado del tensioactivo Sotatercept (Triton-X en citrato)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en T-100, 10 mM de citrato, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 5,8								
	2 mg/ml de T-100			0,2 mg/ml de T-100			0,02 mg/ml de T-100		
	Sin control de agitación	Agitación a TA		Sin control de agitación	Agitación a TA		Sin control de agitación	Agitación a TA	
		4 d	7 d		4 d	7 d		4 d	7 d
Conc. (mg/ml)	54,25	56,55	52,35	55,61	54,53	52,93	56,25	53,24	55,06
pH	5,61	5,72	5,73	5,19	6,07	4,33	5,87	6,00	5,06
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,180	0,190	0,195	0,205	0,220	0,200	0,120	0,180	0,140
UP-SEC									
% HMW	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
% Monómero	93,2	93,3	93,1	93,3	93,3	93,2	93,1	93,2	93,1
% LMW	5,4	5,3	5,4	5,3	5,3	5,4	5,5	5,4	5,5
cIEF									
% Ácido	14,0	13,8	13,8	14,3	13,7	13,9	13,8	13,9	13,9
% Principal 1	45,9	46,8	46,5	45,6	46,3	46,4	46,1	46,4	46,4
% Principal 2	27,0	27,0	27,0	27,3	27,3	26,9	27,1	27,2	27,0
% Básico	13,1	12,4	12,7	12,8	12,7	12,8	13,0	12,4	12,8

Tabla 36: Viabilidad y estabilidad del líquido Sotatercept (controles en citrato)						
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de citrato, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 5,8					
	Sin tensioactivo			0,2 mg/ml de PS-80		
	Sin control de agitación	Agitación a TA		Sin control de agitación	Agitación a TA	
		4 d	7 d		4 d	7 d
Conc. (mg/ml)	53,46	55,66	53,75	NT	55,4	52,81
pH	5,79	5,61	4,56	NT	5,76	6,25
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,193	0,255	0,210	NT	0,185	0,115
UP-SEC						
% HMW	1,4	1,4	1,4	NT	1,4	1,4
% Monómero	93,2	93,2	93,2	NT	93,2	93,3
% LMW	5,4	5,4	5,4	NT	5,4	5,3
cIEF						
% Ácido	14,0	14,5	14,2	NT	14,1	14,2
% Principal 1	45,8	45,7	46,3	NT	46,0	46,1
% Principal 2	27,4	27,0	26,6	NT	27,3	26,9
% Básico	12,9	12,9	13,0	NT	12,6	12,8

Los resultados muestran que Sotatercept es estable frente al estrés de agitación en tampón de citrato y no hay diferencia significativa entre los tensioactivos probados al comparar especies de carga, especies de monómeros, agregados o fragmentación.

Las Tablas 37 a 41 muestran estudios de estabilidad del tensioactivo para Sotatercept realizados mediante estrés de agitación agitando los viales que contenían Sotatercept en tampón de histidina de 10 mM, 8 % de sacarosa con niveles variables de tensioactivos. Los tensioactivos cribados fueron Poloxámero-188, dodecil sulfato de sodio (SDS), N-dodecil- β -D-maltósido (DDM), Polisorbato-20 y Triton X a 0,02 mg/ml, 0,2 mg/ml y 2 mg/ml durante

4 días y 7 días. La Tabla 42 muestra estudios de estabilidad del tensioactivo para el control que contiene Sotatercept en tampón de histidina de 10 mM, 8 % de sacarosa y sin tensioactivo.

Tabla 37: Cribado del tensioactivo Sotatercept (N-dodecil-β-D-maltósido en citrato)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en DDM, 10 mM de histidina, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 5,8								
	2 mg/ml de DDM			0,2 mg/ml de DDM			0,02 mg/ml de DDM		
	Sin control de agitación	Agitación a TA		Sin control de agitación	Agitación a TA		Sin control de agitación	Agitación a TA	
		4 d	7 d		4 d	7 d		4 d	7 d
Conc. (mg/ml)	NT	NT	NT	50,96	50,18	51,73	51,56	50,14	52,64
pH	5,84	5,67	5,89	5,86	5,61	5,98	5,81	5,61	6,00
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	NT	NT	NT	0,165	0,165	0,285	0,180	0,130	0,290
UP-SEC									
% HMW	1,1	1,2	1,1	1,0	1,0	1,1	1,0	1,1	1,6
% Monómero	93,3	93,7	93,5	91,2	92,6	92,0	92,3	93,7	91,4
% LMW	5,6	5,0	5,4	7,7	6,4	6,9	6,7	5,2	7,0
cIEF									
% Ácido	15,4	14,7	14,9	14,9	14,4	15,1	15,2	15,0	15,4
% Principal 1	46,3	47,4	48,2	46,2	47,2	48,0	46,9	48,9	48,0
% Principal 2	25,5	25,3	25,8	25,5	25,8	25,3	25,3	25,3	25,2
% Básico	12,9	12,6	11,1	13,4	12,6	11,6	12,6	10,7	11,4

Tabla 38: Cribado del tensioactivo Sotatercept (Poloxámero-188 en histidina)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en P-188, 10 mM de histidina, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 5,8								
	2 mg/ml de P-188			0,2 mg/ml de P-188			0,02 mg/ml de P-188		
	Sin control de agitación	Agitación a TA		Sin control de agitación	Agitación a TA		Sin control de agitación	Agitación a TA	
		4 d	7 d		4 d	7 d		4 d	7 d
Conc. (mg/ml)	51,40	49,36	51,51	52,46	50,20	51,23	51,22	50,28	50,50
pH	5,82	5,75	5,90	5,93	5,71	6,03	5,85	5,75	5,92
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,170	0,160	0,185	0,220	0,160	0,250	0,105	0,220	0,290
UP-SEC									
% HMW	1,1	1,1	1,0	1,1	1,1	1,1	1,0	1,1	1,0
% Monómero	92,9	93,3	92,2	93,2	93,4	93,2	92,1	93,3	92,2
% LMW	6,0	5,6	6,8	5,7	5,5	5,8	6,9	5,7	6,7
cIEF									
% Ácido	15,2	14,9	14,7	15,2	14,6	15,0	15,1	14,7	14,2
% Principal 1	46,1	47,0	46,8	46,9	49,3	47,0	46,5	47,6	47,6
% Principal 2	25,9	25,3	25,7	25,3	25,4	25,6	25,5	25,1	25,8
% Básico	12,8	12,8	12,8	12,6	10,7	12,4	12,9	12,5	12,4

Tabla 39: Cribado del tensioactivo Sotatercept (Polisorbato-20 en histidina)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en PS-20, 10 mM de histidina, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 5,8								
	2 mg/ml de PS-20			0,2 mg/ml de PS-20			0,02 mg/ml de PS-20		
	Sin control de agitación	Agitación a TA		Sin control de agitación	Agitación a TA		Sin control de agitación	Agitación a TA	
		4 d	7 d		4 d	7 d		4 d	7 d
Conc. (mg/ml)	50,19	50,30	50,65	48,56	50,13	52,21	51,48	51,34	51,38
pH	5,82	5,70	5,94	5,82	5,73	6,02	5,85	5,72	5,90
Turbidez $A_{350-500}$	0,115	0,125	0,140	0,145	0,165	0,215	0,195	0,215	0,150
UP-SEC									
% HMW	1,0	1,1	1,1	1,0	1,1	1,0	1,0	1,1	1,0
% Monómero	92,2	93,1	91,6	92,2	92,9	92,0	91,9	92,6	91,8
% LMW	6,8	5,8	7,3	6,8	6,0	6,9	7,1	6,3	7,2
cIEF									
% Ácido	15,4	14,8	14,9	15,4	14,9	15,1	15,2	15,0	15,0
% Principal 1	46,0	47,2	47,2	45,9	48,0	47,2	46,7	47,5	47,3
% Principal 2	25,4	25,3	25,5	25,0	25,5	25,5	25,7	25,4	25,3
% Básico	13,3	12,6	12,4	13,6	11,6	12,2	12,3	12,1	12,4

Tabla 40: Cribado del tensioactivo Sotatercept (dodecilsulfato de sodio en histidina)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en SDS, 10 mM de histidina, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 5,8								
	2 mg/ml de SDS			0,2 mg/ml de SDS			0,02 mg/ml de SDS		
	Sin control de agitación	Agitación a TA		Sin control de agitación	Agitación a TA		Sin control de agitación	Agitación a TA	
		4 d	7 d		4 d	7 d		4 d	7 d
Conc. (mg/ml)	52,28	49,70	51,31	51,65	50,35	52,18	51,16	50,56	51,78
pH	6,05	5,76	6,21	5,86	5,59	5,99	5,84	5,62	5,94
Turbidez $A_{350-500}$	0,175	0,195	0,330	0,155	0,155	0,285	0,155	0,140	0,265
UP-SEC									
% HMW	4,6	4,4	4,6	1,4	1,2	1,2	1,1	1,0	1,1
% Monómero	88,3	88,6	88,1	93,0	92,0	91,7	93,2	93,5	93,0
% LMW	7,1	7,0	7,4	5,6	6,8	7,0	5,7	5,5	5,9
cIEF									
% Ácido	15,1	15,3	15,2	14,9	14,9	15,4	14,8	15,5	14,9
% Principal 1	45,2	46,6	46,5	46,7	47,3	47,1	47,0	47,2	47,5
% Principal 2	25,1	24,9	24,8	25,6	25,5	25,5	25,5	25,1	26,0
% Básico	14,6	13,2	13,4	12,7	12,3	12,0	12,8	12,3	11,6

Tabla 41: Cribado del tensioactivo Sotatercept (Triton-X en histidina)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en T-100, 10 mM de histidina, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 5,8								
	2 mg/ml de T-100			0,2 mg/ml de T-100			0,02 mg/ml de T-100		
	Sin control de agitación	Agitación a TA		Sin control de agitación	Agitación a TA		Sin control de agitación	Agitación a TA	
		4 d	7 d		4 d	7 d		4 d	7 d
Conc. (mg/ml)	50,73	49,98	51,27	51,95	50,28	51,69	50,72	50,19	51,44
pH	5,86	5,63	5,95	5,85	5,62	5,97	5,94	5,63	6,02
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,130	0,195	0,355	0,150	0,165	0,205	0,130	0,160	0,255
UP-SEC									
% HMW	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,1
% Monómero	91,7	92,0	91,6	92,3	92,8	91,8	93,1	92,6	92,1
% LMW	7,4	7,0	7,3	6,7	6,2	7,2	5,8	6,3	6,8
cIEF									
% Ácido	15,8	14,5	14,9	15,2	15,1	15,2	15,1	14,9	14,9
% Principal 1	45,8	49,0	46,1	46,3	47,2	46,3	46,7	47,5	47,2
% Principal 2	25,5	25,6	25,3	25,6	25,0	25,5	25,9	25,3	25,8
% Básico	12,9	10,9	13,7	12,9	12,7	13,0	12,3	12,3	12,1

Tabla 42: Cribado del tensioactivo Sotatercept (controles en histidina)						
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de histidina, 8 % (peso/volumen) de sacarosa, pH 5,8					
	Sin control de tensioactivos			0,2 mg/ml de PS-80		
	Sin control de agitación	Agitación a TA		Sin control de agitación	Agitación a TA	
		4 d	7 d		4 d	7 d
Conc. (mg/ml)	51,42	50,67	51,45	50,87	50,48	51,45
pH	5,83	5,67	5,98	5,83	5,62	5,91
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,130	0,185	0,205	0,160	0,170	0,205
UP-SEC						
% HMW	1,0	1,1	1,0	1,0	1,1	1,0
% Monómero	92,1	92,0	91,8	91,5	93,3	91,9
% LMW	6,9	6,9	7,2	7,5	5,7	7,0
cIEF						
% Ácido	14,9	14,9	14,9	15,4	14,8	15,2
% Principal 1	47,2	48,4	47,2	45,4	47,0	47,0
% Principal 2	25,4	25,5	25,6	26,0	25,6	25,8
% Básico	12,6	11,2	12,2	13,1	12,5	11,9

Los resultados muestran que Sotatercept es estable frente al estrés por agitación cuando se formula con los tensioactivos probados en tampón de histidina. A altas concentraciones de SDS, se detectaron especies de peso molecular ligeramente superior. No existe diferencia significativa entre los tensioactivos probados cuando se observan las especies de carga después del estrés de agitación.

Estudios de quelantes

Las formulaciones que comprenden Sotatercept (SEQ ID NO: 32) en tampón de citrato de 10 mM, 8 % de sacarosa y 0,02 % de Polisorbato-80 a un pH de 5,8 con diferentes niveles (0 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM) de L-metionina se expusieron a estrés lumínico en una cámara de fotoestabilidad en presencia de diferentes niveles de DTPA o EDTA como agentes quelantes (0 μ M, 7,5 μ M, 15 μ M, 30 μ M, 60 μ M). Las muestras estresadas junto con los controles oscuros se analizaron para la formación de alto peso molecular (usando UPSEC) y se demostró que la adición de L-metionina redujo la formación de % de HMW y que no hubo un efecto negativo al agregar quelantes. Los resultados se muestran en las Figuras 14 y 15, Por tanto, cualquiera de los quelantes se puede utilizar en la formulación.

Además, Sotatercept se formuló con tampón de citrato de 10 mM o tampón de histidina de 10 mM, 8 % de sacarosa y 0,02 % de Polisorbato-80 a un pH de 5,8 con diferentes niveles (0 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM) de dimercaprol. Las muestras fueron expuestas a estrés lumínico en una cámara de fotoestabilidad. Las muestras estresadas junto con los controles oscuros se analizaron para la formación de alto peso molecular (usando UPSEC) y mostraron la adición de dimercaprol. Los resultados de varias pruebas de formulaciones que comprenden Sotatercept, tampón de citrato de 10 mM, 8 % de sacarosa y 0,02 % de Polisorbato-80 a un pH de 5,8 con diferentes niveles (0 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM) de dimercaprol se muestran en la Tabla 43 y los resultados del control oscuro se muestran en la Tabla 44. Los resultados de varias pruebas de formulaciones que comprenden Sotatercept, tampón de histidina de 10 mM, 8 % de sacarosa y 0,02 % de Polisorbato-80 a un pH de 5,8 con diferentes niveles (0 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM) de dimercaprol se muestran en la Tabla 45 y los resultados del control oscuro se muestran en la Tabla 46.

Tabla 43: Cribado del antioxidante Sotatercept (dimercaprol en citrato)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de citrato, 80 mg/ml de sacarosa, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8								
	50 mg/ml de Dimercaprol			10 mg/ml de Dimercaprol			5 mg/ml de Dimercaprol		
	Luz visible			Luz visible			Luz visible		
	0,2X	0,5X	DC	0,2X	0,5X	DC	0,2X	0,5X	DC
Conc. (mg/ml)	NT	NT	NT	50,69	53,61	53,84	53,57	54,49	54,88
pH	6,09	6,13	6,18	5,81	5,89	5,99	5,79	5,89	5,82
Turbidez $A_{350-500}$	NT	NT	NT	0,290	0,240	,0245	0,235	,0335	0,180
UP-SEC									
% HMW	67,7	66,4	66,7	50,3	71,3	58,9	7,8	15,3	1,8
% Monómero	22,8	19,7	23,7	40,8	22,6	32,9	85,8	78,4	91,3
% LMW	9,5	13,9	9,6	8,9	6,1	8,2	6,5	6,3	6,9
cIEF									
% Ácido	NT	NT	NT	6,1	4,2	5,2	15,9	17,0	14,0

% Principal 1	NT	NT	NT	17,4	8,3	14,2	38,8	33,7	44,3
% Principal 2	NT	NT	NT	10,0	4,4	8,8	28,3	28,6	27,3
% Básico	NT	NT	NT	66,6	83,0	71,8	17,0	20,7	14,4
Tabla 44: Cribado del antioxidante Sotatercept (controles en citrato)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de citrato, 80 mg/ml de sacarosa, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8								
	Sin control antioxidante					20 mM de L-metionina			
	Luz visible					Luz visible			
	0,2X	0,5X	DC	0,2X	0,5X	DC	0,2X	0,5X	DC
Conc. (mg/ml)	52,99	43,52	53,09	52,94	55,71	53,42			
pH	5,82	5,92	5,77	6,03	5,92	5,85			
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,160	0,310	0,170	0,225	0,235	0,220			
UP-SEC									
% HMW	8,9	17,7	1,4	7,8	16,1	1,4			
% Monómero	86,0	77,4	93,1	87,0	78,8	93,1			
% LMW	5,1	5,0	5,4	5,2	5,1	5,5			
cIEF									
% Ácido	15,4	23,2	13,8	15,0	15,5	13,9			
% Principal 1	39,4	33,9	45,3	40,7	35,5	44,8			
% Principal 2	28,8	22,3	27,3	27,7	27,4	27,7			
% Básico	16,4	20,5	13,5	16,6	21,6	13,7			

Tabla 45: Cribado del antioxidante Sotatercept (dimercaprol en histidina)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de Histidina, 80 mg/ml de Sacarosa, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8								
	50 mg/ml de Dimercaprol			10 mg/ml de Dimercaprol			5 mg/ml de Dimercaprol		
	Luz visible			Luz visible			Luz visible		
	0,2X	0,5X	DC	0,2X	0,5X	DC	0,2X	0,5X	DC
Conc. (mg/ml)	NT	NT	NT	53,48	52,25	51,49	51,51	51,19	50,65
pH	NT	NT	NT	5,82	5,90	5,85	5,81	5,79	5,80
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	NT	NT	NT	1,220	0,490	0,780	0,290	0,350	0,175
UP-SEC									
% HMW	NT	NT	NT	53,3	71,2	58,9	7,2	16,3	1,1
% Monómero	NT	NT	NT	38,1	24,6	32,9	86,6	77,8	92,8
% LMW	NT	NT	NT	8,6	4,2	8,2	6,2	5,8	6,1
cIEF									
% Ácido	NT	NT	NT	NT	NT	NT	17,2	17,1	15,1
% Principal 1	NT	NT	NT	NT	NT	NT	43,2	41,1	46,0
% Principal 2	NT	NT	NT	NT	NT	NT	26,1	24,6	25,8
% Básico	NT	NT	NT	NT	NT	NT	13,5	17,2	13,2

Tabla 46: Cribado del antioxidante Sotatercept (controles en histidina)						
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de citrato, 80 mg/ml de sacarosa, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8					
	Sin control antioxidante			20 mM de L-metionina		
	Luz visible			Luz visible		
	0,2X	0,5X	DC	0,2X	0,5X	DC
Conc. (mg/ml)	51,24	51,82	50,25	50,43	51,67	50,93
pH	5,79	5,78	5,85	5,80	5,80	5,81
Turbidez A ₃₅₀ -500	0,295	0,355	0,180	0,255	0,275	0,170
UP-SEC						
% HMW	7,2	15,9	1,1	6,8	15,0	1,1
% Monómero	86,8	77,9	93,0	87,5	78,9	93,3
% LMW	6,0	6,3	5,9	5,7	6,1	5,7
cIEF						
% Ácido	17,4	16,9	15,0	16,5	16,5	15,5
% Principal 1	42,9	41,0	46,4	42,1	41,3	45,9
% Principal 2	26,1	24,9	25,5	25,8	24,7	25,2
% Básico	13,7	17,2	13,2	15,7	17,6	13,4

Los resultados muestran que la inclusión de bajas concentraciones de dimercaprol como antioxidante fue capaz de proporcionar una protección comparable a las muestras de control bajo estrés lumínico tanto en tampón de citrato como de histidina. La inclusión de mayores cantidades de dimercaprol con estrés lumínico resultó en un aumento de especies de carga y una mayor pérdida de contenido de monómero, lo que indica que la formulación no era compatible con un mayor contenido de dimercaprol como antioxidante.

Cribado estabilizador

Se analizó el comportamiento de Sotatercept (SEQ ID NO: 32) en varios estabilizadores. Los estabilizadores probados fueron carboximetilcelulosa (CMC), dextrosa, polietilenglicol (PEG), albúmina, kleptose, prolina, trehalosa, manitol y dextrano. Las Tablas 47 a 56 muestran los resultados de las formulaciones de Sotatercept que comprenden 10 mM de citrato, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml y Polisorbato-80 a pH 5,8 con los diversos tensioactivos. En la Tabla 57 se muestran los resultados de la formulación de control de citrato sin tensioactivos. Las Tablas 58 a 67 muestran los resultados de las formulaciones de Sotatercept que comprenden 10 mM de histidina, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml y Polisorbato-80 a pH 5,8 con los diversos tensioactivos. En la Tabla 68 se muestran los resultados de una formulación de control sin tensioactivos. Las formulaciones se sometieron a estrés térmico a 50 °C hasta dos semanas y se probaron para determinar su estabilidad

biofísica (turbidez), formación de partículas subvisibles (medida por Aura), formación de alto peso molecular (a través de UPSEC), agregación (a través de UPSEC) y fragmentación (a través de UPSEC).

Tabla 47: Cribado estabilizador de Sotatercept (Polietilenglicol-300 en citrato)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de citrato, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8								
	50 mg/ml de PEG-300			25 mg/ml de PEG-300			5 mg/ml de PEG-300		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		1 W	2 W		1 W	2 W		1 W	2 W
Conc. (mg/ml)	55,07	58,01	51,8	54,24	56,61	51,65	54,43	56,40	52,02
pH	5,47	6,01	5,90	5,95	5,96	5,89	6,00	6,03	5,94
Turbidez $A_{350-500}$	0,205	0,230	0,225	0,260	0,215	0,195	0,255	0,260	0,215
UP-SEC									
% HMW	1,7	4,2	5,2	1,6	3,7	4,6	1,5	3,3	4,2
% Monómero	93,2	89,6	87,5	93,3	90,0	88,0	93,4	90,4	88,5
% LMW	5,1	6,2	7,3	5,1	6,3	7,4	5,1	6,3	7,3
cIEF									
% Ácido	13,8	15,6	16,3	13,6	15,1	16,3	13,3	14,1	15,0
% Principal 1	46,8	34,9	28,5	47,5	35,5	29,5	47,6	38,8	31,5
% Principal 2	26,5	25,7	23,6	26,6	25,1	23,4	26,8	24,3	23,6
% Básico	13,0	23,8	31,7	12,3	24,3	30,8	12,3	22,7	29,9

Tabla 48: Cribado estabilizador de Sotatercept (Polietilenglicol-3350 en citrato)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de citrato, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8								
	50 mg/ml de PEG-3350			25 mg/ml de PEG-3350			5 mg/ml de PEG-3350		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		1 W	2 W		1 W	2 W		1 W	2 W
Conc. (mg/ml)	56,31	60,66	42,31	55,70	57,03	39,46	54,33	56,29	53,28
pH	5,99	NT	6,01	6,12	5,92	6,03	5,72	6,00	6,00
Turbidez $A_{350-500}$	0,290	0,290	0,105	0,290	0,270	0,080	0,245	0,250	,0235
UP-SEC									
% HMW	1,7	4,4	5,5	1,6	3,9	4,9	1,5	3,3	4,3
% Monómero	93,1	89,6	87,5	93,3	90,0	87,9	93,4	90,4	88,5
% LMW	5,2	6,0	7,0	5,1	6,1	7,2	5,1	6,2	7,2
cIEF									
% Ácido	13,7	14,2	15,1	13,8	14,3	15,1	13,8	14,1	15,1
% Principal 1	47,4	37,2	30,5	47,5	37,5	31,8	47,3	38,7	31,5
% Principal 2	26,6	24,9	23,6	26,5	24,9	23,6	26,5	24,3	23,2
% Básico	12,4	23,7	30,8	12,2	23,3	29,6	12,4	22,9	30,2

Tabla 49: Cribado estabilizador de Sotatercept (carboximetilcelulosa (CMC) en citrato)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de citrato, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8								
	10 mg/ml de CMC			5 mg/ml de CMC			1 mg/ml de CMC		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		1 W	2 W		1 W	2 W		1 W	2 W
Conc. (mg/ml)	55,90	55,39	52,88	54,99	60,16	52,42	54,54	54,39	52,37
pH	5,83	5,98	5,92	5,87	5,97	5,90	5,73	5,83	5,90
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,245	0,190	0,215	0,275	0,225	0,240	0,255	0,225	0,140
UP-SEC									
% HMW	1,5	5,3	6,4	1,5	5,1	6,4	1,5	4,2	5,3
% Monómero	93,3	88,6	86,6	93,3	88,7	86,4	93,4	89,7	87,7
% LMW	5,1	6,1	6,9	5,2	6,2	7,2	5,1	6,2	7,1
cIEF									
% Ácido	10,7	11,9	14,2	12,2	12,9	14,7	13,6	14,0	15,3
% Principal 1	51,5	41,5	33,3	48,8	40,0	32,7	47,5	39,8	32,3
% Principal 2	25,8	24,3	24,1	26,9	25,2	24,1	26,7	24,7	24,1
% Básico	12,0	22,2	28,3	12,1	21,9	28,5	12,3	21,5	28,3

Tabla 50: Cribado estabilizador de Sotatercept (dextrano en citrato)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de citrato, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8								
	20 mg/ml de Dextrano			10 mg/ml de Dextrano			5 mg/ml de Dextrano		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		1 W	2 W		1 W	2 W		1 W	2 W
Conc. (mg/ml)	55,81	57,65	52,91	55,89	57,38	52,78	55,10	56,22	53,59
pH	5,87	5,8	5,89	5,89	5,82	6,05	5,83	5,89	5,92
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,290	0,285	0,140	0,250	0,280	0,290	0,225	0,145	0,220
UP-SEC									
% HMW	1,8	3,9	5,0	1,6	3,7	4,6	1,5	3,4	4,4
% Monómero	93,1	89,9	87,9	93,0	90,1	88,2	93,3	90,4	88,4
% LMW	5,1	6,1	7,2	5,4	6,2	7,2	5,2	6,2	7,2
cIEF									
% Ácido	13,7	14,0	15,0	14,3	13,9	15,3	13,7	14,3	15,2
% Principal 1	47,7	37,8	31,7	46,5	37,9	31,4	47,3	37,3	31,6
% Principal 2	26,3	25,0	23,5	25,8	25,0	23,3	26,6	24,8	23,2
% Básico	12,4	23,2	29,9	13,4	23,2	30,0	12,4	23,7	30,0

Tabla 51: Cribado estabilizador de Sotatercept (dextrosa en citrato)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de citrato, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8								
	80 mg/ml de Dextrosa			40 mg/ml de Dextrosa			5 mg/ml de Dextrosa		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		1 W	2 W		1 W	2 W		1 W	2 W
Conc. (mg/ml)	55,02	57,2	54,26	54,60	56,09	54,21	54,14	57,48	52,77
pH	5,82	5,97	5,97	5,94	6,09	5,95	5,76	5,85	6,01
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,295	0,345	0,780	0,250	0,250	0,520	0,230	0,205	0,255
UP-SEC									
% HMW	1,5	3,6	7,7	1,5	3,4	6,1	1,5	3,3	4,4
% Monómero	93,4	90,1	85,3	93,4	90,3	86,4	93,5	90,5	88,4
% LMW	5,1	6,3	7,0	5,2	6,3	7,5	5,1	6,3	7,2
cIEF									
% Ácido	13,9	18,7	27,4	13,8	16,6	22,3	13,7	14,7	15,7
% Principal 1	47,0	33,6	23,7	47,2	36,7	28,1	47,5	38,0	31,9
% Principal 2	26,9	30,4	31,2	26,8	28,3	28,1	26,6	25,0	24,1
% Básico	12,3	17,3	17,7	12,2	18,4	21,5	12,2	22,4	28,3

Tabla 52: Cribado estabilizador de Sotatercept (manitol en citrato)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de citrato, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8								
	80 mg/ml de Manitol			40 mg/ml de Manitol			5 mg/ml de Manitol		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		1 W	2 W		1 W	2 W		1 W	2 W
Conc. (mg/ml)	55,31	57,74	53,02	55,27	58,38	53,17	55,09	56,08	52,17
pH	5,77	6,00	5,86	5,74	5,93	5,94	6,01	6,02	5,91
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,260	0,200	0,210	0,145	0,160	0,215	0,270	0,155	0,175
UP-SEC									
% HMW	1,5	2,9	3,5	1,5	3,0	3,8	1,5	3,2	4,1
% Monómero	93,5	90,8	89,1	93,5	90,7	89,0	93,5	90,6	88,7
% LMW	5,1	6,3	7,4	5,1	6,2	7,2	5,0	6,2	7,2
cIEF									
% Ácido	13,7	14,0	14,5	13,5	14,1	15,2	13,9	14,4	14,9
% Principal 1	47,3	37,5	32,0	47,3	39,0	31,2	47,0	37,7	31,8
% Principal 2	26,7	25,0	23,4	26,7	24,3	23,6	26,9	25,0	23,5
% Básico	12,3	23,6	30,1	12,5	22,5	30,1	12,2	22,9	29,8

Tabla 53: Cribado estabilizador de Sotatercept (trehalosa en citrato)

Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de citrato, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8								
	80 mg/ml de Trehalosa			40 mg/ml de Trehalosa			5 mg/ml de Trehalosa		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		1 W	2 W		1 W	2 W		1 W	2 W
Conc. (mg/ml)	55,05	56,64	52,76	52,91	56,43	54,54	55,01	56,04	53,10
pH	6,00	5,90	5,99	5,94	5,90	6,02	5,88	5,96	5,90
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,255	0,205	0,185	0,285	0,250	0,170	0,285	0,230	0,220
UP-SEC									
% HMW	1,5	2,7	3,4	1,5	2,9	3,7	1,5	3,2	4,1
% Monómero	93,4	90,9	89,3	93,4	90,8	88,9	93,4	90,4	88,8
% LMW	5,2	6,4	7,4	5,2	6,3	7,4	5,1	6,3	7,1
cIEF									
% Ácido	14,1	14,2	14,5	13,8	13,8	14,5	13,9	14,2	15,1
% Principal 1	47,0	37,9	31,5	47,2	37,9	31,6	46,7	37,3	31,6
% Principal 2	26,8	24,7	23,3	26,8	25,0	23,8	26,7	25,0	23,5
% Básico	12,2	23,3	30,7	12,2	23,3	29,4	12,7	23,5	29,8

Tabla 54: Cribado estabilizador de Sotatercept (Kleptose en citrato)

Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de citrato, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8								
	20 mg/ml de Kleptose			5 mg/ml de Kleptose			0,5 mg/ml de Kleptose		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		1 W	2 W		1 W	2 W		1 W	2 W
Conc. (mg/ml)	55,60	56,60	66,95	54,73	74,74	56,10	55,27	56,59	53,75
pH	5,82	5,99	6,10	5,84	NT	5,83	5,91	5,97	5,95
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,255	0,195	0,525	0,245	0,230	0,320	0,245	0,230	0,255
UP-SEC									
% HMW	1,5	3,2	4,1	1,5	3,3	4,2	1,5	3,4	4,1
% Monómero	93,3	90,5	88,7	93,4	90,4	88,7	93,4	90,3	88,7
% LMW	5,2	6,3	7,2	5,1	6,3	7,1	5,1	6,4	7,2
cIEF									
% Ácido	13,6	14,0	14,8	13,8	14,4	14,9	13,8	14,4	14,9
% Principal 1	47,1	38,8	31,6	47,2	37,2	31,7	47,1	37,3	31,2
% Principal 2	26,8	24,5	23,5	26,7	25,0	23,7	27,0	24,9	23,4
% Básico	12,5	22,7	30,1	12,3	23,4	29,8	12,1	23,6	30,5

Tabla 55: Cribado estabilizador de Sotatercept (prolina en citrato)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de citrato, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8								
	50 mg/ml de Prolina			5 mg/ml de Prolina			0,5 mg/ml de Prolina		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		1 W	2 W		1 W	2 W		1 W	2 W
Conc. (mg/ml)	55,29	56,13	52,81	54,75	56,57	53,50	54,35	56,02	53,32
pH	6,02	5,98	5,96	5,97	6,08	5,84	6,20	5,90	5,81
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,215	0,205	0,190	0,200	0,160	0,220	0,235	0,205	0,190
UP-SEC									
% HMW	1,5	2,9	4,2	1,5	3,2	4,2	1,5	3,3	4,2
% Monómero	93,4	90,6	88,8	93,4	90,4	88,7	93,4	90,5	88,6
% LMW	5,1	6,4	7,0	5,1	6,3	7,2	5,1	6,2	7,3
cIEF									
% Ácido	14,2	13,4	13,9	14,0	13,6	14,7	14,2	14,3	15,3
% Principal 1	46,0	36,5	31,3	47,1	39,0	31,7	46,1	37,5	30,9
% Principal 2	27,4	24,5	22,9	26,7	24,4	23,6	26,8	25,0	23,7
% Básico	12,4	25,6	31,9	12,2	23,00	30,0	13,0	23,1	30,1

Tabla 56: Cribado estabilizador de Sotatercept (albúmina en citrato)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de citrato, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8								
	40 mg/ml de Dextrano			10 mg/ml de Dextrano			0,5 mg/ml de Dextrano		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		1 W	2 W		1 W	2 W		1 W	2 W
Conc. (mg/ml)	67,54	68,94	66,95	60,56	61,94	56,10	56,25	56,61	53,75
pH	6,08	6,16	6,10	6,17	6,18	5,83	6,37	5,89	5,95
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,510	0,515	0,525	0,360	0,335	0,320	0,235	0,190	0,255
UP-SEC									
% HMW	3,0	4,9	3,5	2,1	3,8	4,1	1,5	3,2	4,2
% Monómero	78,8	75,9	88,8	87,6	84,7	88,7	93,2	90,5	88,6
% LMW	18,1	19,2	7,7	10,2	11,5	7,2	5,3	6,3	7,2
cIEF									
% Ácido	13,4	13,9	16,0	13,4	14,3	15,2	13,7	14,4	15,1
% Principal 1	45,7	37,5	33,3	48,0	38,3	32,2	47,9	37,0	31,6
% Principal 2	25,9	24,9	25,0	25,8	25,5	24,0	26,7	25,1	23,2
% Básico	15,0	23,7	25,7	12,7	21,9	28,6	11,8	23,5	30,1

Tabla 57: Cribado estabilizador de Sotatercept (controles en citrato)						
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de citrato, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8					
	Sin control del estabilizador			80 mg/ml de Sacarosa		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		1 W	2 W		1 W	2 W
Conc. (mg/ml)	55,93	56,21	52,93	50,84	57,46	57,43
pH	5,83	5,84	6,07	5,83	5,83	6,04
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,200	0,235	0,200	0,250	0,250	0,225
UP-SEC						
% HMW	1,5	3,2	5,5	1,5	2,7	4,4
% Monómero	93,3	90,5	74,8	93,4	90,9	84,2
% LMW	5,2	6,3	19,7	5,1	6,5	11,4
cIEF						
% Ácido	13,6	14,0	15,1	13,5	13,9	14,4
% Principal 1	47,0	37,7	31,6	47,3	38,0	31,8
% Principal 2	26,9	25,1	23,6	26,8	25,1	23,6
% Básico	12,4	23,3	29,8	12,4	23,0	30,2

Los resultados muestran que bajo estrés térmico elevado, la inclusión de los estabilizadores probados en las formulaciones proporcionó niveles similares de estabilidad a la molécula de Sotatercept en tampón de citrato. Cada una de las formulaciones probadas mantuvo un alto contenido de monómero y tuvo aumentos comparables en especies de alto peso molecular a lo largo del tiempo y niveles comparables de especies cargadas en comparación con las muestras que no contenían un estabilizador.

Tabla 58: Cribado estabilizador de Sotatercept (Polietilenglicol-300 en histidina)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de histidina, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8								
	50 mg/ml de PEG-300			25 mg/ml de PEG-300			5 mg/ml de PEG-300		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		1 W	2 W		1 W	2 W		1 W	2 W
Conc. (mg/ml)	50,98	52,53	51,64	50,21	52,24	51,12	50,08	51,34	51,52
pH	5,68	5,85	5,98	5,71	5,90	5,98	5,73	5,92	5,94
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,155	0,215	0,310	0,125	0,225	0,190	0,160	0,195	0,175
UP-SEC									
% HMW	1,4	4,8	7,5	1,3	4,3	6,5	1,3	3,7	5,7
% Monómero	93,1	89,1	84,6	92,9	89,6	86,1	93,0	90,0	86,8
% LMW	5,5	6,2	7,9	5,7	6,2	7,4	5,7	6,3	7,5
cIEF									
% Ácido	14,6	13,4	12,9	14,8	13,3	12,5	14,6	13,1	13,2
% Principal 1	45,2	34,1	28,6	45,7	34,8	30,0	46,4	36,0	31,6
% Principal 2	27,4	23,7	21,5	27,4	23,7	22,2	27,2	24,2	22,6
% Básico	12,8	28,8	37,0	12,2	28,2	35,2	11,8	26,8	32,6

Tabla 59: Cribado estabilizador de Sotatercept (Polietilenglicol-3350 en histidina)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de histidina, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8								
	50 mg/ml de PEG-3350			25 mg/ml de PEG-3350			5 mg/ml de PEG-3350		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		1 W	2 W		1 W	2 W		1 W	2 W
Conc. (mg/ml)	54,42	54,97	54,14	51,39	52,64	51,77	50,77	51,65	51,02
pH	5,79	5,96	5,97	5,79	5,94	5,96	5,74	5,95	5,95
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,175	0,240	0,260	0,240	0,235	0,240	0,160	0,190	0,180
UP-SEC									
% HMW	1,4	5,1	7,9	1,2	4,9	7,7	1,2	3,8	5,9
% Monómero	93,0	88,7	84,8	93,1	89,2	84,8	93,5	89,4	86,7
% LMW	5,6	6,2	7,3	5,7	5,9	7,5	5,3	6,8	7,4
cIEF									
% Ácido	14,5	12,9	13,1	14,6	13,3	12,8	14,5	13,0	13,3
% Principal 1	46,4	35,6	30,3	46,1	36,5	30,5	46,1	37,2	30,4
% Principal 2	27,7	23,6	21,9	27,4	23,1	22,1	27,6	23,1	22,7
% Básico	11,3	27,9	34,8	11,9	27,2	34,6	11,8	26,7	33,6

Tabla 60: Cribado estabilizador de Sotatercept (carboximetilcelulosa (CMC) en histidina)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de histidina, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8								
	10 mg/ml de CMC			5 mg/ml de CMC			1 mg/ml de CMC		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		1 W	2 W		1 W	2 W		1 W	2 W
Conc. (mg/ml)	50,58	52,13	51,72	50,82	52,09	52,22	50,40	51,63	51,62
pH	5,68	5,98	6,01	5,74	6,04	6,08	5,66	6,05	6,06
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,150	0,215	0,220	0,165	0,215	0,255	0,145	0,245	0,245
UP-SEC									
% HMW	1,3	6,1	8,2	1,1	6,2	8,2	1,1	5,2	6,9
% Monómero	93,0	87,8	84,9	93,3	87,6	84,8	93,0	89,0	86,4
% LMW	5,7	6,1	6,9	5,5	6,2	7,0	5,9	5,8	6,7
cIEF									
% Ácido	11,9	12,6	13,7	13,0	13,2	14,7	14,6	13,6	14,3
% Principal 1	49,3	39,3	33,6	46,9	40,0	31,9	46,5	38,9	31,5
% Principal 2	27,1	25,0	24,4	28,1	25,4	24,0	27,6	24,2	23,9
% Básico	11,7	23,2	28,3	12,0	21,5	29,4	11,2	23,2	30,3

Tabla 61: Cribado estabilizador de Sotatercept (dextrano en histidina)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de histidina, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8								
	20 mg/ml de Dextrano			10 mg/ml de Dextrano			5 mg/ml de Dextrano		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		1 W	2 W		1 W	2 W		1 W	2 W
Conc. (mg/ml)	50,91	52,06	52,77	51,70	52,90	50,97	50,37	51,68	50,81
pH	5,70	5,92	5,99	5,72	5,96	5,98	5,75	5,97	6,01
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,145	0,210	0,240	0,205	0,210	0,210	0,125	0,125	0,200
UP-SEC									
% HMW	1,2	4,7	6,9	1,4	4,2	6,1	1,3	3,9	5,6
% Monómero	93,5	89,3	86,7	93,0	89,6	86,0	93,0	89,9	87,0
% LMW	5,4	6,0	6,4	5,6	6,1	7,9	5,7	6,2	7,4
cIEF									
% Ácido	14,8	13,5	14,9	14,5	13,4	13,7	14,3	13,0	13,5
% Principal 1	45,6	37,6	32,2	46,1	36,0	31,0	45,9	37,3	31,1
% Principal 2	27,7	23,6	17,2	27,8	24,1	22,7	27,9	23,8	22,7
% Básico	12,0	25,3	35,7	11,6	26,3	32,6	11,8	25,9	32,7

Tabla 62: Cribado estabilizador de Sotatercept (dextrosa en histidina)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de histidina, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8								
	80 mg/ml de Dextrosa			40 mg/ml de Dextrosa			5 mg/ml de Dextrosa		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		1 W	2 W		1 W	2 W		1 W	2 W
Conc. (mg/ml)	50,47	50,76	51,59	50,34	51,75	50,81	50,59	52,46	50,81
pH	5,62	5,96	6,00	5,64	5,91	5,98	5,64	6,97	5,99
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,175	0,385	0,920	0,140	0,305	0,580	0,120	0,210	0,235
UP-SEC									
% HMW	1,1	3,1	6,7	1,2	3,2	5,7	1,3	3,6	5,4
% Monómero	93,6	90,6	86,1	93,7	90,9	86,1	93,0	90,2	87,2
% LMW	5,3	6,3	7,3	5,1	5,8	8,2	5,6	6,2	7,4
cIEF									
% Ácido	15,1	17,9	25,8	14,9	15,8	19,9	14,8	13,6	14,2
% Principal 1	45,6	34,0	23,9	45,3	36,0	28,1	45,6	36,0	30,9
% Principal 2	27,5	30,6	30,4	27,6	28,2	28,8	27,4	24,5	23,5
% Básico	11,8	17,4	20,0	12,2	19,9	23,3	12,36	26,0	31,3

Tabla 63: Cribado estabilizador de Sotatercept (manitol en histidina)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de histidina, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8								
	80 mg/ml de Manitol			40 mg/ml de Manitol			5 mg/ml de Manitol		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		1 W	2 W		1 W	2 W		1 W	2 W
Conc. (mg/ml)	52,97	53,60	51,82	50,61	51,67	50,80	50,01	51,36	51,40
pH	5,61	5,89	6,01	5,72	5,91	6,03	5,69	5,97	6,11
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,145	0,200	0,195	0,125	0,165	0,180	0,120	0,150	0,175
UP-SEC									
% HMW	1,2	2,7	3,7	1,3	3,0	4,2	1,1	3,2	5,2
% Monómero	93,3	961,1	89,2	93,0	90,7	89,0	93,4	90,5	87,5
% LMW	5,5	6,2	7,1	5,7	6,3	6,8	5,5	6,3	7,4
cIEF									
% Ácido	14,7	13,3	13,2	14,9	13,2	13,6	14,7	12,8	13,4
% Principal 1	45,8	36,4	31,4	45,5	36,3	30,5	45,9	37,9	30,9
% Principal 2	27,5	24,2	22,9	27,6	24,4	22,8	27,7	23,8	23,1
% Básico	12,0	26,0	32,5	12,0	26,1	33,0	11,7	25,4	32,7

Tabla 64: Cribado estabilizador de Sotatercept (trehalosa en histidina)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de histidina, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8								
	80 mg/ml de Trehalosa			40 mg/ml de Trehalosa			5 mg/ml de Trehalosa		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		1 W	2 W		1 W	2 W		1 W	2 W
Conc. (mg/ml)	50,61	51,97	51,38	50,18	56,08	53,41	50,13	51,22	50,50
pH	5,58	5,89	6,02	5,62	5,90	6,05	5,67	5,90	6,05
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,160	0,190	0,190	0,160	0,225	0,250	0,165	0,190	0,195
UP-SEC									
% HMW	1,1	2,5	3,7	1,1	2,9	4,3	1,2	3,5	5,0
% Monómero	93,2	91,5	89,5	93,4	91,1	89,0	93,6	90,7	88,1
% LMW	5,7	6,0	6,8	5,5	6,0	6,7	5,2	5,9	7,0
cIEF									
% Ácido	14,5	13,7	13,6	14,6	13,1	13,4	14,9	13,2	13,5
% Principal 1	45,4	36,5	30,7	45,5	36,5	31,8	45,7	36,2	31,6
% Principal 2	27,4	24,4	23,0	27,8	24,7	23,1	27,6	24,4	23,0
% Básico	12,6	25,4	32,6	12,1	25,7	31,7	11,7	26,2	31,9

Tabla 65: Cribado estabilizador de Sotatercept (Kleptose en histidina)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de histidina, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8								
	20 mg/ml de Kleptose			5 mg/ml de Kleptose			0,5 mg/ml de Kleptose		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		1 W	2 W		1 W	2 W		1 W	2 W
Conc. (mg/ml)	50,55	51,82	50,63	50,18	51,24	50,10	50,51	51,64	50,68
pH	5,64	5,98	5,98	5,75	5,93	5,94	5,77	2,94	5,98
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,135	0,205	0,190	0,165	0,190	0,145	0,140	0,200	0,200
UP-SEC									
% HMW	1,3	3,5	5,4	1,3	3,6	5,4	1,3	3,7	5,3
% Monómero	93,0	90,7	87,4	93,0	90,5	87,8	93,0	90,4	87,2
% LMW	5,6	5,8	7,2	5,7	5,9	6,8	5,7	6,0	7,5
cIEF									
% Ácido	14,6	12,6	14,4	15,0	13,0	13,9	14,8	13,4	14,1
% Principal 1	45,8	37,6	33,1	45,6	37,5	31,7	45,6	35,8	31,4
% Principal 2	27,6	23,8	17,1	27,3	23,5	18,2	27,4	24,0	18,4
% Básico	12,0	26,0	35,4	12,1	26,0	36,2	12,2	26,8	36,1

Tabla 66: Cribado estabilizador de Sotatercept (prolina en histidina)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de histidina, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8								
	50 mg/ml de Prolina			5 mg/ml de Prolina			0,5 mg/ml de Prolina		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		1 W	2 W		1 W	2 W		1 W	2 W
Conc. (mg/ml)	5,045	52,14	51,17	49,95	50,85	50,38	49,96	51,21	50,71
pH	5,76	6,00	6,02	5,83	5,88	5,91	5,72	5,88	6,01
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,095	0,200	0,205	0,130	0,125	0,155	0,135	0,175	0,175
UP-SEC									
% HMW	1,1	2,7	3,8	1,1	3,4	5,1	1,1	3,6	5,4
% Monómero	93,3	90,8	88,6	93,2	90,1	87,0	93,6	90,5	87,2
% LMW	5,6	6,5	7,7	5,7	6,4	7,9	5,3	5,9	7,4
cIEF									
% Ácido	14,9	13,1	14,1	14,8	13,1	13,4	14,9	12,9	14,3
% Principal 1	45,7	37,4	31,0	45,7	37,5	32,1	45,7	36,8	32,7
% Principal 2	27,7	24,0	18,5	27,3	23,8	18,7	27,3	24,1	18,3
% Básico	11,8	25,5	36,3	12,2	25,6	35,9	12,1	26,2	34,7

Tabla 67: Cribado estabilizador de Sotatercept (albúmina en histidina)									
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de histidina, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8								
	40 mg/ml de Dextrano			10 mg/ml de Dextrano			0,5 mg/ml de Dextrano		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		1 W	2 W		1 W	2 W		1 W	2 W
Conc. (mg/ml)	61,07	63,92	62,30	53,20	55,11	54,27	50,06	51,12	51,18
pH	5,88	6,15	6,15	5,75	6,03	6,05	5,71	6,01	6,04
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,370	0,500	0,510	0,220	0,260	0,290	0,165	0,195	0,220
UP-SEC									
% HMW	2,6	5,5	6,7	1,3	3,1	4,6	1,2	3,6	5,3
% Monómero	80,4	77,0	75,9	90,0	87,4	85,0	94,0	89,9	87,3
% LMW	17,0	17,5	17,4	8,7	9,5	10,5	4,9	6,5	7,4
cIEF									
% Ácido	14,0	14,3	14,5	14,7	13,6	15,2	14,7	13,5	13,9
% Principal 1	45,1	38,1	28,8	45,0	37,4	28,7	46,0	36,3	31,8
% Principal 2	26,4	24,7	21,7	27,8	24,4	21,9	27,8	24,0	18,6
% Básico	14,5	22,8	35,1	12,5	24,6	34,2	11,5	26,2	35,7

Tabla 68: Cribado estabilizador de Sotatercept (controles en histidina)						
Ensayo	50 mg/ml de Sotatercept en 10 mM de histidina, 20 mM de L-metionina, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80, pH 5,8					
	Sin control del estabilizador			80 mg/ml de Sacarosa		
	Inicial	50 °C		Inicial	50 °C	
		1 W	2 W		1 W	2 W
Conc. (mg/ml)	48,89	50,89	50,54	51,58	53,36	52,90
pH	5,76	6,07	6,08	5,88	5,90	5,95
Turbidez A ₃₅₀₋₅₀₀	0,135	0,185	0,220	0,165	0,195	0,245
UP-SEC						
% HMW	1,1	3,6	5,3	1,1	2,7	3,6
% Monómero	93,3	90,3	87,2	93,2	91,5	89,2
% LMW	5,6	6,1	7,5	5,6	5,8	7,2
cIEF						
% Ácido	14,5	13,2	14,1	15,0	13,5	13,7
% Principal 1	45,5	37,9	31,6	45,6	36,3	31,8
% Principal 2	27,8	23,6	18,4	28,2	24,6	19,8
% Básico	12,2	25,3	35,9	11,2	25,6	34,7

Los resultados muestran que bajo estrés térmico elevado, la inclusión de los estabilizadores probados en las formulaciones proporcionó niveles similares de estabilidad a la molécula de Sotatercept en tampón de histidina. Cada una de las formulaciones probadas mantuvo altos contenidos de monómeros y tuvo aumentos comparables en especies de alto peso molecular a lo largo del tiempo y niveles comparables de especies cargadas.

Formulaciones de Sotatercept

Las Tablas 69 a 71 muestran formulaciones farmacéuticas líquidas que contienen Sotatercept (SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 41 o una mezcla de SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 41) que se prepararon:

Tabla 69

Proteína de fusión ActRIIA humana SEQ ID NO: 32	50 mg/ml
tampón de citrato	10 mM
Sacarosa	8 % peso/volumen
Polisorbato-80	0,2 mg/ml
L-metionina	20 mM

Tabla 70

Proteína de fusión ActRIIA humana SEQ ID NO: 41	50 mg/ml
tampón de citrato	10 mM
Sacarosa	8 % peso/volumen
Polisorbato-80	0,2 mg/ml
L-metionina	20 mM

Tabla 71

Proteína de fusión ActRIIA humana SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 41	50 mg/ml
tampón de citrato	10 mM
Sacarosa	8 % peso/volumen
Polisorbato-80	0,2 mg/ml
L-metionina	20 mM

SECUENCIAS

Tabla 72: Secuencias

SEQ ID NO: 9	MGAAAKLAFVFLISCSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHC FATWKNISGSIEIVKQGCWLD DINC YDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEME VTQPTSNPVT PKPPYYNLLYSLVPLMLIAGIVICAFWVYRHHK MAYPPVLVPTQDPGPPPP SPLLGLKPLQLLEV KARGRF GCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVS LPMKH ENILQFIGAEKRGTSDVDLWLITAFHEKGSLSDFL KANVVS WNELCHIAETMARGLAYLH EDIPGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFLALKEAGKSAGDTHGQVGTRRY MAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELASRCTAADGPVDEYMLPFEEIEIGQHPSL EDMQEVVVHKKRPLRDYWKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMQ RLTNIITTEDIVTVVTMVTNVDFPPKESSL
SEQ ID NO: 10	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD DINC YDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVT PKPP
SEQ ID NO: 11	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD DINC YDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM
SEQ ID NO: 12	ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGGCGTCTTTCTTATCTCCTGTTCTTCAGGTGCT ATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGCTTTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGA CAGAACCAATCAAACCTGGTGTTGAACCGTGTTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCAT TGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCATTGAAATAGTGAAACAAGG TTGTTGGCTG GATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGAT TGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGG CAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCGGAGATG GAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCTATTA CAACATCTG CTCTATTCCT TGGTGCCACT TATGTTAATT GCGGGGATTGTCATTTGTGCATTTTGGGTGTACAGGCATCACAAGATGGCCTACCCCTCC TGTA CTGTTCCA ACTCAAGACCCAGGACCACCCCACTTCTCCATTACTAGGTTTGA AACCACTGCAGTTATTAGAAGTGAAAGCAAGGGGAAGATTTGGTTGTGTCTGGAAAAGC CCAG TTGCTTAACGAATATGTGGCTGTCAAAATATTTCCAATACAGGACAAACAGTCATGGCA AAATGAATACGAAGTCTACAGTTTGCCTGGA ATGAAGCATGAGAACATATTACAGTTCATTGGTGCAGAAAAACGAGGCACCAGTGTG ATGTGGATCTTTGGCTGATCAGCATTTTCATGAAAAGGGTTCACTATCAGACTTTCTT AAGGCTAATGTGGTCTCTTGAATGAACTGTGTCATATTGCAGAAACCATGGCTAGAG GATTGGCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCTAAAAGATGGCC ACAAACCTGCCATATCTCACAGGGACATCAAAAGTAAAAATGTGCTGTTGAAAAACAA CCTGACAGCTTGCA TTGCTGACTTTGGGTTGGCCTTAAAATTTGAGGCTGGCAAGCTG CAGGCGATACCCATGGACAGGTTGGTACCCGGAGGTACATGGCTCCAGAGGTATTAGA GGGTGCTATAAACTTCAAAGGGATGCATTTTTGAGGATAGATATGTATGCCATGGGAT TAGTCCTATGGGAACTGGCTTCTCGCTGTACTGCTGCAGATGGACCTGTAGATGAATAC ATGTTGCCATTTGAGGAGGAAATTGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGCAGGAAG TTGTTGTGCATAAAAAAAGAGGCCTGTTTTAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGG AATGGCAATGCTCTGTGAAACCATGAAGAATGTTGGGATCACGACGCAGAAGCCAGG TTATCAGCTGGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGAGACTAACAAATATTA TTACCACAGAGGACATTGTAACAGTGGTCACAATGGTGACAAATGTTGACTTTCCTCCC AAAGAATCTAGTCTA
SEQ ID NO:13	ATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGCTTTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGA CAGAACCAATCAAACCTGGTGTTGAACCGTGTTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCAT TGTTTTGCTACCTGGAAGAATAT

	TTCTGGTTCATTGAAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTG GATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAG TATATTTTGTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTCTTATTTTCCGGAGA TGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCC
SEQ ID NO: 32	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD DINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVTPQTSNPVTPKPPTGGGTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 41	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD DINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVTPQTSNPVTPKPPTGGGTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
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	MKFLVNVALVFMVVIYSIYA
SEQ ID NO: 34	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP
SEQ ID NO: 35	MGAAAKLAFVFLISCSSGA
SEQ ID NO: 36	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDK DKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKF SYFPMEVTPQTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO: 37	ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGT TTCGCCCGGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTTTAATGC TAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGTATGGTGACAAA GATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCCATTGAATAGTG AAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAA AAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAA GTTTTCTTATTTTCCGGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTA AGCCACCCACCGGTGGTGGAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCT GGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCC GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACT GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGTCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG CCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCGTACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA

	CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGC TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA GAATTC
SEQ ID NO: 38	ILGRSETQE
SEQ ID NO: 62	ILGRSETQECIFYNANWERDRTNRTGVESCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD DINCYDRDTCIEKKDSPEVYFCCCEGNMCNERFSYFPEMEVTQPTSNPVT PKP
SEQ ID NO: 65	ILGRSETQECIYYNANWEKDKTNRSIEPCYGDGDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD DINCYDRNDTCIEKKDSPEVFFCCCEGNMCNERFFYFPEMEVTQPTSNPVT PKP
SEQ ID NO: 66	ILGRSETQECIFYNANWERDRTNRTGVESCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD DINCYDRDTCIEKKDSPEVYFCCCEGNMCNERFSYFPEMEVTQPTSNPVT PKP
SEQ ID NO: 67	ILGRSETQECIYYNANWEKDKTNRSIEPCYGDGDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD DINCYDRNDTCIEKKDSPEVFFCCCEGNMCNERFFYFPEMEVTQPTSNPVT PKP
SEQ ID NO: 68	ILGRSETQECIFYNANWERDKNRTGVELCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD DINCYDRDTCIEKKDSPEVYFCCCEGNMCNERFSYFPEMEVTQPTSNPVT PKP

En este documento se describen métodos y materiales de ejemplo, aunque también se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o prueba de los métodos y formulaciones aquí descritos. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en este documento se incorporan por referencia en su totalidad.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica que comprende 50-100 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIa humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 41, un tampón, un tensioactivo, un agente estabilizador y, opcionalmente, uno o más antioxidantes; en donde el tampón no es histidina.
2. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la proteína de fusión tiene una concentración de 100 mg/ml.
3. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la proteína de fusión tiene una concentración de 50 mg/ml.
4. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el tampón se selecciona del grupo que consiste en succinato, fosfato, acetato, citrato y glutamato.
5. La formulación farmacéutica de la reivindicación 4, en donde el tampón es un tampón de fosfato que mantiene un pH de la formulación entre 5-7.
6. La formulación farmacéutica de la reivindicación 4, en donde el tampón es un tampón de citrato que mantiene un pH de la formulación entre 4,5-7.
7. La formulación farmacéutica de la reivindicación 4, en donde el tampón es un tampón de acetato que mantiene un pH de la formulación entre 4,5-6.
8. La formulación farmacéutica de la reivindicación 4, en donde el tampón es un tampón de succinato que mantiene un pH de la formulación entre 4,5-5.
9. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el tampón es un tampón de glutamato que mantiene un pH de la formulación entre 5-7.
10. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el tampón mantiene un pH de 5,8 de la formulación.
11. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el tampón está presente en una concentración entre 10-50 mM.
12. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el tampón está presente en una concentración de al menos 10 mM.
13. La formulación farmacéutica de la reivindicación 12, en donde el agente estabilizante es sacarosa.
14. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el agente estabilizante está presente en una concentración entre 2-16 % de peso/volumen.

15. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el agente estabilizante está presente en una concentración entre 6-10 % de peso/volumen.
16. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el agente estabilizante está presente en una concentración de al menos 8 % de peso/volumen.
17. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en Polisorbato-20, Polisorbato-80, Poloxámero-124, Poloxámero-127, Poloxámero-188 y Poloxámero-407.
18. La formulación farmacéutica de la reivindicación 17, en donde el tensioactivo es Polisorbato-80.
19. La formulación farmacéutica de la reivindicación 17, en donde el tensioactivo es Polisorbato-20.
20. La formulación farmacéutica de la reivindicación 17, en donde el tensioactivo es Poloxámero-188.
21. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en donde el tensioactivo está presente en una concentración entre 0,05-0,5 mg/ml.
22. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en donde el tensioactivo está presente en una concentración de 0,1-0,5 mg/ml.
23. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en donde el tensioactivo está presente en una concentración de al menos 0,2 mg/ml.
24. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en donde la formulación farmacéutica comprende además un antioxidante.
25. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en donde la formulación farmacéutica comprende además un agente quelante, en donde el agente quelante es DTPA o EDTA.
26. La formulación farmacéutica de la reivindicación 25, en donde el agente quelante está presente en una concentración entre 7,5-100 μ M.
27. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 25 a 26, en donde el agente quelante está presente en una concentración de 10 μ M.
28. La formulación farmacéutica de la reivindicación 24, en donde el antioxidante es metionina.

29. La formulación farmacéutica de la reivindicación 28, en donde el antioxidante es L-metionina.

30. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 29, en donde el antioxidante está presente en una concentración de entre 7,5-50 mM.

31. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 29, en donde el antioxidante está presente en una concentración entre 5-20 mM.

32. Una formulación farmacéutica líquida que comprende 50-100 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIa humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 41, 10-50 mM de tampón de citrato, 2-16 % de peso/volumen de sacarosa, 0,05-0,5 mg/ml de Polisorbato-80, Polisorbato-20 o Poloxámero-188, 0-50 mM de L-metionina y 0-100 μ M de DTPA o EDTA.

33. Una formulación farmacéutica líquida que comprende 50 mg/ml de una proteína de fusión ActRIIa humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 41, 10 mM de tampón de citrato, 8 % de peso/volumen de sacarosa, 0,2 mg/ml de Polisorbato-80 y 20 mM de L-metionina.

34. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, en donde la formulación farmacéutica es para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar en un sujeto que lo necesita.

35. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34, en donde la formulación farmacéutica se administra mediante autoinyector.

36. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, en donde la formulación farmacéutica se administra mediante inyección subcutánea.

37. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, en donde la formulación farmacéutica es una formulación líquida.

38. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, en donde la formulación farmacéutica es estable cuando se almacena entre 2-8 °C durante al menos un mes.

39. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 38, en donde la formulación está contenida en un dispositivo de inyección.

40. La formulación farmacéutica de la reivindicación 39, en donde el dispositivo de inyección es un autoinyector.

41. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 38, en donde la formulación está contenida en un vial de vidrio.

42. Un método para tratar la hipertensión arterial pulmonar (HAP) en un paciente humano que lo necesita, que comprende administrar al paciente una formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41.

43. Uso de la formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar (HAP) en un paciente que lo necesita.

RESUMEN

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona formulaciones farmacéuticas líquidas y estables que comprenden una proteína de fusión recombinante que comprende un dominio extracelular (ECD) de la proteína del receptor de activina humano tipo IIA (ActRIIA) o una variante de la misma unida a un dominio constante de una inmunoglobulina, tal como el dominio Fc de IgG1 humana y uno o más aditivos y/o excipientes farmacéuticos.