



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0618893-1 A2**



* B R P I 0 6 1 8 8 9 3 A 2 *

(22) Data de Depósito: 21/11/2006
(43) Data da Publicação: 13/09/2011
(RPI 2123)

(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/395

(54) **Título:** FORMULAÇÕES DE PROTEÍNA DE FUSÃO DE IMUNOGLOBULINA

(30) **Prioridade Unionista:** 22/11/2005 US 60/739,271

(73) **Titular(es):** Wyeth

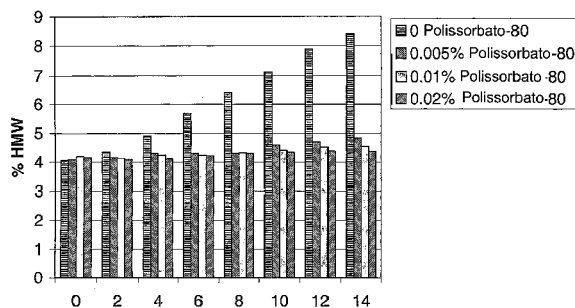
(72) **Inventor(es):** Ajay Kumar, Anthony Barry, Chandra A. Webb, Daniel Dixon, Erin Soley, Jennifer Juneau, Li Li, Michael Shamashkin, Nicholas Luksha, Nicholas W. Warne, Thomas Crowley

(74) **Procurador(es):** Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2006045059 de 21/11/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/062040de 31/05/2007

(57) **Resumo:** FORMULAÇÕES DE PROTEÍNA DE FUSÃO DE IMUNOGLOBULINA. A presente invenção refere-se a composições de proteínas de fusão de Ig, especialmente composições incluindo uma proteína de fusão de Ig, um agente de composição de volume, um dissacarídeo, um tensoativo e um tampão. Em um aspecto, essas composições são estáveis sob armazenamento a longo prazo ou pelo menos um ciclo de congelamento/descongelamento. A invenção também refere-se a métodos de preparação das composições de proteína de fusão de Ig. Em um aspecto, as composições da invenção são liofilizadas. Em um outro aspecto, as composições são liofilizadas através de um processo que inclui uma etapa de anelamento.





PI0618893-1

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**FORMULAÇÕES DE PROTEÍNA DE FUSÃO DE IMUNOGLOBULINA**".

O presente pedido reivindica prioridade ao Pedido U.S. Nº 60/739.271, depositado em 22 de Novembro de 2005, o qual é aqui incorporado por referência.

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se ao campo de formulações de proteína. Mais especificamente, a invenção refere-se à composições farmacêuticas compreendendo proteínas de fusão de imunoglobulina (Ig).

10 Antecedentes

Avanços em biotecnologia têm tornado possível produzir uma ampla variedade de proteínas para aplicações farmacêuticas. Após produção, produtos farmacêuticos de proteína devem, freqüentemente, ser armazenados antes de seu uso. Em virtude, em parte, do fato de que proteínas são geralmente maiores e mais complexas do que produtos farmacêuticos "tradicionais", a formulação e processamento de produtos farmacêuticos de proteína que são adequados para armazenamento podem ser particularmente desafiadores. Para revisões de formulação e design de processo de produtos farmacêuticos de proteína vide Carpenter et al, *Pharmaceutical Research* 14: 969-975 (1997); Wang, *International Journal of Pharmaceutics* 203: 1-60 (2000); e Tang e Pikal, *Pharmaceutical Research* 21: 191-200 (2004).

Vários fatores podem ser considerados no "*designing*" de formulações e processo para a produção de produtos farmacêuticos de proteína. De preocupação primária é a estabilidade da proteína através de qualquer ou todas as etapas de fabricação, embargue e manipulação, as quais podem incluir o preparo da composição, congelamento, secagem, armazenamento, embargue, reconstituição, ciclos de congelamento/descongelamento e armazenamento pós-reconstituição pelo usuário final. Outras considerações potenciais incluem facilidade e economia de fabricação, manipulação e distribuição; composição do produto final para administração a um paciente; e facilidade de uso por um usuário final, incluindo solubilidade da formulação liofilizada quando de reconstituição.

Formulações líquidas podem satisfazer determinados objetivos. Possíveis vantagens de formulações líquidas incluem facilidade e economia de fabricação e conveniência para o usuário final.

5 Formulações liofilizadas podem também proporcionar determinadas vantagens. Benefícios potenciais de liofilização incluem estabilidade aperfeiçoada da proteína, bem como facilidade e economia de embarque e armazenamento.

10 Além da escolha da forma básica da composição (por exemplo, liofilizada, líquida, congelada, etc.), otimização de uma formulação de proteína envolve, tipicamente, variação dos componentes da formulação e suas respectivas concentrações a fim de maximizar a estabilidade da proteína. Uma variedade de fatores podem afetar a estabilidade da proteína, incluindo resistências iônica, pH, temperatura, ciclos de congelamento/descongelamento, forças de cisalhamento, congelamento, secagem, agitação e re-
15 constituição. Instabilidade da proteína pode ser causada por degradação física (por exemplo, desnaturação, agregação ou precipitação) ou degradação química (por exemplo, deamidação, oxidação ou hidrólise). Otimização dos componentes da formulação e concentrações pode incluir estudos empíricos e/ou abordagens racionais para superar fontes de instabilidade.

20 Conseqüentemente, há uma necessidade de proporcionar formulações que permitem armazenamento estável de uma variedade de proteínas e que são adequadas para várias classes de produtos farmacêuticos de proteína e proteínas de fusão de imunoglobulina (Ig) em particular.

Sumário

25 A presente invenção é baseada, pelo menos em parte, na descoberta de determinadas composições contendo proteínas de fusão de Ig que são suficientemente estáveis durante armazenamento a longo prazo e/ou após um ou mais ciclos de congelamento/descongelamento. A invenção proporciona composições farmacêuticas que contêm uma proteína de fusão
30 de Ig e pelo menos os quatro componentes não proteínicos a seguir: (1) um agente de composição de volume, (2) um dissacarídeo, (3) um tensoativo e (4) um tampão. Em algumas modalidades, a composição ainda contém

NaCl. As composições não contêm arginina ou cisteína.

Proteínas de fusão de Ig são conhecidas na técnica e são descritas, por exemplo, nas Patentes U.S. 5.516.964, 5.225.538, 5.428.130, 5.514.582, 5.714.147, 5.455.165 e 6.136.310. Em algumas modalidades, a
5 proteína de fusão de Ig é ácida, por exemplo, uma proteína de fusão de Ig tendo um pl de menos de 6,0. Em modalidades ilustrativas, as proteínas de fusão de Ig ácidas são PSGL-Ig, GP1b-Ig, IL-13R-1g e IL-21R-Ig.

Em algumas modalidades, a proteína de fusão de Ig é altamente ácida, por exemplo, uma proteína de fusão de Ig tendo um pl de menos de
10 4,0. Em modalidades ilustrativas, a proteína de fusão de Ig altamente ácida é PSGL-Ig.

Em algumas modalidades, a porção de não-Ig da proteína de fusão de Ig é um receptor de citocina, por exemplo, um receptor de interleucina. Em modalidades ilustrativas, os receptores de citocina são IL-13R e IL-
15 21R.

Em algumas modalidades, a porção de não-Ig da proteína de fusão de Ig é sulfatada, fosforilada e/ou glicosilada. Em modalidades ilustrativas, as proteínas de fusão de Ig sulfatadas são PSGL-Ig e GP1b-Ig. Em modalidades ilustrativas, as proteínas de fusão de Ig sulfatadas são PSGL-Ig, GP1b-Ig e IL-13R-1g. Em algumas modalidades, as proteínas de fusão de Ig glicosiladas são fucosiladas e/ou sialiladas. Em modalidades ilustrativas, as proteínas de fusão de Ig fucosiladas são PSGL-Ig e GP1b-Ig. Em modalidades ilustrativas, as proteínas de fusão de Ig sialiladas são PSGL-Ig, GP1b-Ig e IL-13R-1g.
20

Exemplos ilustrativos de agentes de composição de volume incluem glicina e manitol. Dissacarídeos ilustrativos incluem sacarose e trealose. Exemplos ilustrativos de tensoativos incluem polissorbato 20 e polissorbato 80. Exemplos ilustrativos de tampões incluem tampões de amina e fosfato. Exemplos ilustrativos de tampões baseados em amina incluem histidina e trometamina (Tris).
25
30

Em algumas modalidades, os componentes das composições da invenção estão presentes em faixas definidas de concentração. Em algumas

modalidades, a concentração de proteína é de 0,025 a 60 mg/ml; a concentração do agente de composição de volume é de 0,5 a 5%; a concentração de dissacarídeo é de 0,5 a 5%; a concentração de tensoativo é de 0,001 a 0,5%; todos independentemente uns dos outros. Em algumas modalidades, a concentração de NaCl é de 1 a 200 mM de NaCl. Em determinadas modalidades, a concentração de NaCl é menos de 35 mM. Em modalidades particulares, as composições farmacêuticas incluem de 1 a 4% de agente de composição de volume, de 0,5 a 2% de dissacarídeo e de 0,005 a 0,02% de tensoativo. Em modalidades ilustrativas, a composição inclui 2% de agente de composição de volume, 1% de dissacarídeo e 0,01% de tensoativo.

A invenção ainda se refere ao estado físico da formulação. A invenção proporciona, sem limitação, formulações líquidas, congeladas, liofilizadas e reconstituídas.

A invenção ainda proporciona métodos de fabricação de composições da invenção, incluindo métodos em que a composição é liofilizada, através de um processo que inclui uma etapa de anelamento.

O sumário precedente e a descrição detalhada a seguir são exemplificativos e explicativos apenas e não são restritivos da invenção, conforme reivindicado.

20 Breve Descrição da Figura

A Figura 1 mostra o efeito de polissorbato-80 sobre a agregação de proteína e recuperação de proteína em formulações de GP1b-Ig após até 14 ciclos de congelamento/descongelamento. GP1b-Ig foi formulada a 2 mg/mL em Tris a 20 mM, pH de 7,2, NaCl a 50 mM e 0%, 0,005%, 0,01% ou 0,02% de polissorbato-80. Frascos de cada formulação foram submetidos até 14 ciclos de congelamento/descongelamento e ensaiados com relação ao % de espécies de elevado peso molecular (HMW) através de SEC-HPLC. A recuperação de proteína foi monitorada através de sinal de detecção de HPLC a 280 e 214 nm. O eixo X mostra o número de ciclos de congelamento/descongelamento. O eixo Y mostra o percentual de HMW.

30 Descrição Detalhada

A presente invenção proporciona composições compreendendo

proteínas de fusão de Ig. A invenção é baseada, pelo menos em parte, na descoberta de que composições compreendendo uma proteína de fusão de Ig, um tampão, um dissacarídeo, um agente de composição de volume e um tensoativo são tornadas suficientemente estáveis para armazenamento a longo prazo e/ou um ou mais ciclos de congelamento/descongelamento. A invenção também proporciona métodos de preparo de composições de fusão de Ig.

Proteínas de Fusão de Ig

A invenção proporciona composições compreendendo proteínas de fusão de imunoglobulina (Ig).

10 Uma proteína de fusão de Ig é uma proteína que compreende (a) uma porção de não-Ig ligada a (b) uma porção de Ig a qual é derivada da região constante de uma imunoglobulina.

Em algumas modalidades, a proteína de fusão de Ig é ácida, por exemplo, uma proteína de fusão de Ig tendo um ponto isoelétrico (pI) de menos de 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5, 3,0 ou 2,5. Em modalidades ilustrativas, por exemplo, as proteínas de fusão de Ig ácidas são PSGL-Ig, GP1b-Ig, IL-13R-Ig e IL-21R-Ig. O ponto isoelétrico de uma proteína é o pH no qual sua carga líquida é zero. Métodos para determinação do ponto isoelétrico de uma proteína de interesse são bem-conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados a, cálculos teóricos baseados na seqüência de aminoácido da proteína e medição direta do pI através de focalização isoelétrica (IEF). Skoog, B. e Wichman, A., Trends Anal. Chem. 5: 82-83 (1986); Patrikios, CS. e Yamasaki, E.N., Anal. Biochem., 231: 82-91 (1995); Alberts et al, Molecular Biology of the Cell, Terceira Edição, página 171 (1994).

25 Em algumas modalidades, a proteína de fusão de Ig é altamente ácida, por exemplo, uma proteína de fusão de Ig tendo um pI de menos de 4,0, 3,5, 3,0 ou 2,5. Em modalidades ilustrativas, a proteína de fusão de Ig altamente ácida é PSGL-Ig.

Em algumas modalidades, a porção de não-Ig da proteína de fusão de Ig é derivada de um receptor, por exemplo, um receptor de citocina. Em modalidades ilustrativas, o receptor de citocina é um receptor de interleucina. Em modalidades ilustrativas, os receptores de citocina são IL-13R e

IL-21R. Outros receptores de citocina podem ser usados, por exemplo, receptores de citocina descritos em *Cytokine Reference*, vol. 2: Receptors, eds. Oppenheim & Feldman, Academic Press, 2001.

5 Em algumas modalidades, a proteína de fusão de Ig compreende uma porção de não-Ig que é sulfatada, fosforilada e/ou glicosilada. Em modalidades ilustrativas, as proteínas de fusão de Ig sulfatadas são PSGL-Ig e GP1b-Ig. Em modalidades ilustrativas, as proteínas de fusão de Ig glicosiladas são PSGL-Ig, GP1b-Ig e IL-13R-Ig. Em algumas modalidades, as proteínas de fusão de Ig glicosiladas são fucosiladas e/ou sialiladas. Em modalidades ilustrativas, as proteínas de fusão de Ig fucosiladas são PSGL-Ig e GP1b-Ig. Em modalidades ilustrativas, as proteínas de fusão de Ig sialiladas são PSGL-Ig, GP1b-Ig e IL-13R-Ig. Métodos para detecção e análise de sulfatação, fosforilação e glicosilação de proteínas são bem-conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, em *Posttranslational Modifications of Proteins: Tools for Functional Proteomics (Methods in Molecular Biology)*, Christoph Kannicht Ed. (2002).

20 Em algumas modalidades, a porção de Ig das proteínas de fusão de Ig é derivada de um domínio de Fc de uma imunoglobulina, por exemplo, IgG (IgG₁, IgG₄ ou outro isotipo de IgG) de seres humanos, murino ou outras espécies e inclui porções funcionais de seqüências de Ig que ocorrem naturalmente, bem como mutações e modificação de tais seqüências. Seqüências de vários domínios Fc são bem-conhecidas na técnica e são proporcionadas, por exemplo, em *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services, eds. Kabat et al, 1991.

25 A porção de Ig pode conter qualquer uma ou mais das seguintes porções do domínio Fc: CH1, CH2, CH3 e a região de dobradiça. Por exemplo, o domínio Fc pode conter CH2, CH3 e a região de dobradiça, mas não CH1.

Adicionalmente, proteínas de fusão de Ig compreendem um ligante que une as porções de não-Ig e de Ig.

30 Em algumas modalidades, a concentração de uma proteína de fusão de Ig em uma composição da invenção é menos de 100 mg/ml, menos de 90 mg/ml, menos de 80 mg/ml, menos de 70 mg/ml, menos de 60 mg/ml,

menos de 50 mg/ml, menos de 40 mg/ml, menos de 30 mg/ml, menos de 20 mg/ml, menos de 15 mg/ml, menos de 10 mg/ml ou menos de 5 mg/ml. Em algumas modalidades, a concentração de uma proteína de fusão de Ig em uma composição da invenção é escolhida das seguintes faixas: de cerca de 0,025 a cerca de 60 mg/ml, de cerca de 0,025 a cerca de 40 mg/ml, de cerca de 0,025 a cerca de 20 mg/ml ou de cerca de 0,025 a cerca de 10 mg/ml. Em uma modalidade ilustrativa, a concentração de proteína de fusão de Ig é cerca de 10 mg/ml.

Tampões

10 As composições da invenção compreendem um tampão o qual, em parte, serve para manter o pH em uma faixa desejada. Tampões adequados para uso na invenção incluem, mas não estão limitados a, tampões de fosfato, citrato, acetato e amina. Tampões de fosfato podem ser, por exemplo, fosfato de potássio ou fosfato de sódio. Tampões de amina podem ser, por exemplo, histidina, tri(hidróximetil)aminometano ("tris") ou dietanolamina.

20 A concentração de um tampão nas composições da invenção pode ser escolhida das seguintes faixas: de cerca de 1 a cerca de 1000 mM, de cerca de 1 a cerca de 200 mM, de cerca de 1 a cerca de 100 mM, de cerca de 1 a cerca de 50 mM, de cerca de 1 a cerca de 40 mM, de cerca de 1 a cerca de 30 mM, de cerca de 1 a cerca de 20 mM ou de cerca de 1 a cerca de 10 mM. Em uma modalidade ilustrativa, a concentração de tampão na composição é cerca de 10 mM.

25 O pH de uma composição da invenção pode ser escolhido das seguintes faixas: de 4 a 10, de 5 a 9, de preferência de 6 a 8. Desconforto para o paciente pode ser minimizado através de ajuste do pH de uma composição injetada em ou próximo dos níveis fisiológicos. Para essa finalidade, é preferível que o pH da composição farmacêutica seja de cerca de 5,8 a cerca de 8,4 ou, mais preferivelmente, de cerca de 6,2 a cerca de 7,4. Ajustes de rotina do pH para dentro ou fora dessas faixas podem ser necessários para melhorar a solubilidade ou estabilidade do polipeptídeo ou outros componentes da composição.

30

Dissacarídeos

As composições da invenção ainda compreendem um dissacarídeo. De preferência, o dissacarídeo é um açúcar de não-redução, por exemplo, sacarose ou trealose. Em determinadas modalidades, a concentração de dissacarídeo na composição é escolhida das seguintes faixas: de 0,5 a 5%, de 0,5 a 4%, de 0,5 a 3%, de 0,5 a 2,5%, de 0,5 a 2%, de 0,5 a 1,5%, de 0,5 a 1%, de 1 a 1,5%, de 1,5 a 2%, de 2 a 2,5%, de 2,5 a 3%, de 3 a 4%, de 4 a 5% ou mais de 5%. Em modalidades particulares, a concentração de dissacarídeo na composição é cerca de 0,5 a 5%, por exemplo, cerca de 0,5 a 2,0%. Em modalidades ilustrativas, a concentração de dissacarídeo é 0,9 ou 1,0%.

Em um aspecto, o dissacarídeo serve para estabilizar a proteína durante congelamento. Uma vez que a proteção durante congelamento pode depender da concentração absoluta do dissacarídeo (Carpenter et al, Pharmaceutical Research 14: 969-975 (1997)), concentrações maiores do que 5% podem ser necessárias a fim de maximizar a estabilidade.

Em um aspecto, o dissacarídeo estabiliza a proteína durante secagem. Proteção durante secagem pode depender da proporção em massa final entre o dissacarídeo e a proteína. Carpenter et al, Pharmaceutical Research 14: 969-975 (1997). Conseqüentemente, em algumas modalidades, a concentração de dissacarídeo é selecionada para obter a proporção em massa desejada de dissacarídeo para proteína, tipicamente pelo menos 1:1. Em algumas modalidades, a estabilidade é otimizada em uma proporção em massa de dissacarídeo:proteína de cerca de 5:1. Em outras modalidades, a proporção em massa de dissacarídeo:proteína é 10:1 , 20:1 , 30:1 , 40:1 , 50:1 , 100:1 , 200:1 , 300:1 , 400:1 , 500:1 , 600:1 , 700:1 , 800:1 , 900:1 , 1000:1 ou maior do que 1000:1.

O dissacarídeo pode atuar como um lioprotetor ou crioprotetor. "Lioprotetores" incluem substâncias que impedem ou reduzem a instabilidade química ou física de uma proteína quando de liofilização e subsequente armazenamento. Em um aspecto, o lioprotetor impede ou reduz as instabilidades químicas ou físicas na proteína à medida que água é removida da

composição durante o processo de secagem. Em um outro aspecto, o lioprotetor estabiliza a proteína ajudando a manter a conformação apropriada da proteína através de ligação a hidrogênio.

"Crioprotetores" incluem substâncias que proporcionam estabilidade à proteína congelada durante produção, congelamento, armazenamento, manipulação, distribuição, reconstituição ou uso. Em um aspecto particular, "crioprotetores" incluem substâncias que protegem a proteína de estresses induzidos pelo processo de congelamento. Crioprotetores podem ter efeitos de lioproteção.

10 Agentes de Composição de Volume

A composição da invenção ainda compreende um ou mais agentes de composição de volume dos seguintes: glicina e manitol. Os agentes de composição de volume servem para contribuir para a massa e estrutura física da torta liofilizada. Em um aspecto, agentes de composição de volume contribuem para a formação de uma torta elegante. Mais especificamente, agentes de composição de volume promovem a formação de uma torta que é esteticamente aceitável, uniforme ou mecanicamente forte. Agentes de composição de volume também promovem a formação de uma estrutura de poro aberto e a facilidade ou velocidade de reconstituição. Agentes de composição de volume também reduzem ou impedem o colapso da torta, fusão eutética ou retenção de umidade residual. Em outro aspecto, agentes de composição de volume ajudam a proteger a proteína contra estresses (por exemplo, estresses físicos e químicos) e ajudam a manter a atividade da proteína.

25 Em determinadas modalidades, a concentração de agente de composição de volume na composição é escolhida das seguintes faixas: de 0,5 a 1%, de 1 a 1,5%, de 1,5 a 2%, de 2 a 2,5%, de 2,5 a 3%, de 3 a 3,5%, de 3,5 a 4%, de 4 a 4,5%, de 4,5 a 5%, mais de 5%, de 0,5 a 5%, de 0,5 a 4%, de 0,5 a 3%, de 0,5 a 2,5%, de 0,5 a 2%, de 0,5 a 1,5% ou de 0,5 a 1%.

30 Em determinadas modalidades, a concentração de agente de composição de volume é 0,5 a 5%, por exemplo, 0,5 a 3%, ainda mais precisamente 1,8 a 2%.

Tensoativos

De preferência, a composição da invenção também compreende um tensoativo. Em um aspecto, tensoativos protegem a proteína de estresses induzidos nas interfaces (por exemplo, uma interface ar/solução ou interface solução/superfície). Em uma modalidade, tensoativos impedem ou reduzem a agregação. Tensoativos incluem detergentes, tais como polissorbato, por exemplo, polissorbato-20 ou polissorbato-80 e polímeros, tal como polietileno glicol. Uma variedade de tensoativos são conhecidos na técnica (vide, por exemplo, a Patente U.S. 6.685.940, coluna 16, linhas 10-35). Em uma modalidade ilustrativa, o tensoativo é polissorbato-80 derivado de vegetal.

Em determinadas modalidades, a concentração de tensoativo na composição é de 0,001 a 0,5%, de 0,001 a 0,2%, de 0,001 a 0,1%, de 0,001 a 0,05%, de 0,001 a 0,01% ou de 0,001 a 0,005%. Em modalidades ilustrativas, a concentração de tensoativo na composição é de 0,005 a 0,01%.

Outros Componentes

A composição pode ainda compreender componentes farmacologicamente aceitáveis adicionais. Componentes adicionais adequados incluem modificadores de tonicidade adicionais e outros excipientes conhecidos na técnica.

Um modificador de tonicidade é uma substância que contribui para a osmolaridade da composição. A osmolaridade do soro humano é cerca de 300 ± 50 mOsM/kg. Para manter a estabilidade da proteína e minimizar o desconforto para o paciente, geralmente é preferível que a composição farmacêutica seja isotônica, isto é, tenha osmolaridade aproximadamente igual ao soro humano. Conseqüentemente, a osmolaridade da composição é, de preferência, de 180 a 420 mOsM/kg. Contudo, aqueles versados na técnica compreenderão que a osmolaridade da composição pode ser maior ou menor, conforme condições específicas venham a requerer. Uma variedade de modificadores de tonicidade são conhecidos na técnica (vide, por exemplo, parágrafo 0047 do Pedido de Patente U.S. 20030180287). Outros componentes da composição incluindo, mas não limitado a, tampões, dissa-

carídeos, agentes de composição de volume e tensoativos, também podem contribuir para a osmolaridade da composição.

Excipientes incluem, mas não estão limitados a, aditivos químicos, co-solutos e co-solventes. De preferência, excipientes contribuem para a estabilidade da proteína, mas deve ser compreendido que excipientes podem, de outro modo, contribuir para as propriedades físicas, químicas e biológicas da composição. Uma variedade de excipientes são conhecidos na técnica (vide, por exemplo, parágrafos 0048-0049 do Pedido de Patente U.S. 20030180287).

Em algumas modalidades, a composição ainda compreende cloreto de sódio. Em modalidades particulares, a composição compreende 1-200 mM ou menos de 50 mM, menos de 40 mM, menos de 35 mM, menos de 30 mM, menos de 25 mM, menos de 20 mM, menos de 15 mM, menos de 10 mM ou menos de 5 mM NaCl. Sob determinadas condições, NaCl pode causar dificuldade durante liofilização ou levar ao aparecimento de opalescência no liofilizado reconstituído. Conseqüentemente, em uma modalidade particular, a composição não compreende NaCl.

Deve ser compreendido que determinados componentes da composição podem ser interpermutados com alternativas conhecidas na técnica. Contudo, aqueles versados na técnica também compreenderão que a inclusão de determinados componentes excluirá o uso de outros componentes, concentrações ou métodos de preparo da composição farmacêutica, por razões que incluem, mas não estão limitadas a, compatibilidade química, pH, tonicidade e estabilidade.

As composições da invenção contêm não mais do que 0,5 mM, 0,1 mM, 0,01 mM, nenhum nível detectável ou nada de qualquer um de arginina ou seus sais ou cisteína ou seus sais. Esses compostos não são adicionados no preparo da composição ou não podem ser detectados na composição, em mais do que esses limites. Essas restrições se aplicam apenas aos aminoácidos livres e seus sais, em oposição à arginina e/ou cisteína presente no polipeptídeo.

Modalidades Ilustrativas

Em algumas modalidades, a composição farmacêutica consiste essencialmente em uma proteína de fusão de Ig, um tampão, um dissacarídeo, um agente de composição de volume e um tensoativo. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica compreende uma proteína de fusão de Ig, um tampão, um dissacarídeo, um agente de composição de volume e um tensoativo.

Em uma modalidade ilustrativa, a composição farmacêutica compreende uma quantidade farmacologicamente eficaz de uma proteína de fusão de Ig, de 1 mM a 1 M de tampão, de 0,5 a 5% de dissacarídeo, de 0,5 a 5% de agente de composição de volume e de 0,001 a 0,5% de tensoativo. Em uma outra modalidade, a composição farmacêutica compreende uma quantidade farmacologicamente eficaz de uma proteína de fusão de Ig, de 1 mM a 1 M de tampão, de 0,5 a 5% de dissacarídeo, de 0,5 a 5% de agente de composição de volume, de 0,001 a 0,5% de tensoativo e de 1 a 200 mM de NaCl. Em uma outra modalidade, a composição farmacêutica compreende uma quantidade farmacologicamente eficaz de uma proteína de fusão de Ig, de 1 mM a 1 M de tampão, de 0,5 a 5% de dissacarídeo, de 0,5 a 5% de agente de composição de volume, de 0,001 a 0,5% de tensoativo e menos de 35 mM de NaCl. Em uma outra modalidade, a composição farmacêutica compreende uma quantidade farmacologicamente eficaz de uma proteína de fusão de Ig, de 1 mM a 1 M de tampão, de 0,5 a 5% de dissacarídeo, de 0,5 a 5% de agente de composição de volume e de 0,001 a 0,5% de tensoativo e não contém NaCl.

Em uma modalidade ilustrativa, a composição farmacêutica compreende de 0,025 a 20 mg/ml de proteína de fusão de Ig, de 5 a 30 mM de tampão, de 0,5 a 2% de dissacarídeo, de 1,5 a 2,5 de agente de composição de volume e de 0,001 a 0,02% de tensoativo.

Em uma modalidade ilustrativa, a composição farmacêutica compreende cerca de 10 mg/ml de proteína de fusão de Ig, cerca de 10 mM de tampão, cerca de 1,8 a cerca de 2% de agente de composição de volume, de cerca de 0,9 a cerca de 1% de dissacarídeo e de cerca de 0,005 a 0,01% de tensoativo.

Em uma outra modalidade, a composição farmacêutica compreende cerca de 10 mg/ml de uma proteína de fusão de Ig, cerca de 10 mM de tampão, de cerca de 1,8 a cerca de 2% de glicina, de cerca de 0,9 a cerca de 1% de dissacarídeo e de cerca de 0,005 a cerca de 0,01% de tensoativo.

5 Em uma outra modalidade, a composição farmacêutica compreende cerca de 10 mg/ml de proteína de fusão de Ig, cerca de 10 mM de tampão, de cerca de 1,8 a cerca de 2% de manitol, de cerca de 0,9 a cerca de 1% de dissacarídeo, de cerca de 0,005 a cerca de 0,01% de tensoativo e menos de 35 mM de NaCl.

10 Em uma modalidade ilustrativa, a composição farmacêutica compreende 10 mg/ml de PSGL-Ig, 10 mM de histidina, 260 mM de glicina, 10 mM de NaCl, 1% de sacarose e 0,005% de polissorbato-80.

Em uma modalidade ilustrativa, a composição farmacêutica compreende 10 mg/ml de GP1b-Ig, 10 mM de histidina, 1,8% de glicina, 25
15 mM de NaCl, 0,9% de sacarose e 0,01% de polissorbato-80.

Em uma modalidade ilustrativa, a composição farmacêutica compreende 10 mg/ml de IL-13R-Ig, 10 mM de Tris, 2% de manitol, 40 mM de NaCl, 1% de sacarose e 0,01% de polissorbato-80.

Estado Físico da Composição

20 Uma variedade de estados físicos são adequados para a composição farmacêutica da invenção incluindo, mas não limitado a, formulações líquidas, líquidas congeladas, liofilizadas e reconstituídas. Formulações reconstituídas incluem composições liofilizadas que tenham sido resuspen-
25 sadas em líquido, tipicamente água para injeção (WFI). Para composições liofilizadas, as concentrações e osmolaridades se referem, tipicamente, àquelas da composição líquida pré-liofilizada, embora esses valores possam, alternativamente, se referir à composição reconstituída. Para composições líquidas congeladas, concentrações e osmolaridades se referem, tipicamente, à
composição líquida antes de congelamento.

30 Métodos de Preparo de Composições Farmacêuticas

Aqueles versados na técnica conhecerão uma variedade de métodos adequados para o preparo da composição farmacêutica da invenção.

Aqueles versados na técnica também compreenderão que alguns componentes podem interagir de forma tal a tornar determinados métodos ou ordens de preparo desfavoráveis.

5 Em uma modalidade, a composição é preparada através de troca de uma proteína purificada em uma solução compreendendo todos os componentes restantes da composição, exceto quanto ao tensoativo, e subsequentemente adição do tensoativo na concentração desejada.

10 Em uma modalidade, a composição é liofilizada através de um processo que inclui uma etapa de anelamento, isto é, manter a composição em uma temperatura acima da temperatura final de congelamento durante um período definido para promover a cristalização dos componentes potencialmente cristalinos. Em um aspecto, anelamento mostra cristalização completa ou mais do agente de composição de volume, o que pode melhorar a estrutura da torta ou estabilidade da proteína. Ainda, cristalização do agente
15 de composição de volume pode aumentar a T_g da fase amorfa, o que pode facilitar secagem mais eficiente, permitindo que a secagem primária seja realizada em uma maior temperatura, novamente resultando em qualidade ou estabilidade aperfeiçoada da torta. Vide Wang, International Journal of
20 Pharmaceutics 203: 1-60 (2000). Ainda, falha em cristalizar completamente o agente de composição de volume pode permitir cristalização durante secagem primária, o que pode levar à quebra do frasco (Tang e Pikal, Pharmaceutical Research 21: 191 -200 (2004) ou cristalização durante armazenamento, o que pode desestabilizar a proteína (Carpenter et al, Pharmaceutical Research 14: 969-975 (1997)).

25 Em uma modalidade ilustrativa, a composição farmacêutica é liofilizada através de um processo compreendendo as seguintes etapas: congelamento da composição a menos de -40°C ; anelamento em uma temperatura entre -5°C e -40°C durante um período de tempo suficiente para promover a cristalização do agente de composição de volume; diminuição da
30 temperatura para abaixo de -35°C ; estabilização de um vácuo; e secagem da composição em uma temperatura entre -20°C e $+30^{\circ}\text{C}$.

Estabilidade

Em um aspecto, a invenção se refere à composições farmacêuticas estável. Uma composição "estável" é uma na qual a proteína na mesma retém essencialmente determinadas propriedades físicas e químicas quando de armazenamento ou uso. Em um aspecto, "armazenamento ou uso" inclui um ou mais ciclos de congelamento/descongelamento. Vários ensaios de estabilidade e/ou instabilidade de proteína são descritos no Exemplo e outros métodos adequados são bem-conhecidos na técnica e revistos, por exemplo, em Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) e Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). Tais ensaios incluem, mas não estão limitados a, quantificação de material de elevado peso molecular (por exemplo, agregados), quantificação de material de baixo peso molecular (por exemplo, degradantes), quantificação da concentração de proteína, quantificação de atividade da proteína e quantificação de modificações de aminoácido pós-traducionais. A composição farmacêutica da invenção contém, de preferência, menos de 10%, menos de 5%, menos de 4%, menos de 3%, menos de 2%, menos de 1% ou menos de 0,5 % de material agregante (elevado peso molecular) ou degradante (baixo peso molecular) quando de armazenamento ou uso. Similarmente, a composição farmacêutica da invenção retém, de preferência, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 100% de atividade da proteína quando de armazenamento ou uso.

Em algumas modalidades, a composição é estável em uma determinada temperatura (por exemplo, -80°C a 40°C, -40°C a 40°C, em torno de 20°C) durante um período de tempo especificado (por exemplo, 1, 4, 7, 12 ou 24 semanas; ou 1, 2, 3, 4, 6, 7,5, 9 ou 12 meses; ou mais).

Em algumas modalidades, a composição é estável após um número especificado de ciclos de congelamento/descongelamento (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 ou mais).

Em um aspecto, a composição farmacêutica é proteína estável através de qualquer uma ou todas as etapas de fabricação, embargue e manipulação, a qual pode incluir preparo da composição, congelamento, seca-

gem, armazenamento, embargue, reconstituição, ciclos de congelamento/descongelamento e armazenamento pós-reconstituição pelo usuário final.

Uma variedade de fatores pode afetar a estabilidade da proteína, incluindo resistência iônica, pH, temperatura, ciclos de congelamento/descongelamento, forças de cisalhamento, congelamento, secagem, agitação e reconstituição. A instabilidade da proteína pode ser causada através de degradação física (por exemplo, desnaturação, agregação ou precipitação) ou degradação química (por exemplo, deamidação, oxidação ou hidrólise).

Exemplos

10 Exemplo 1: Formulação de PSGL-Ig

A. Base de PSGL-Ig

O ligante-1 de glicoproteína de P-selectina (PSGL-1) é o principal receptor de alta afinidade pela P-selectina sobre leucócitos humanos. PSGL-Ig é uma proteína de fusão compreendendo PSGL solúvel ligado a um domínio Fc de IgG₁ humana com mutação, conforme descrito na Patente U.S. 5.827.817. Focalização isoeletrica (IEF) de PSGL-Ig mostra bandas predominantes dentro de uma faixa de pH de 2,8 a 3,3, agrupadas em torno de um pI de aproximadamente 3. Modificações pós-traducionais de PSGL-Ig incluem sulfatação e glicosilação. Glicosilação de PSGL-Ig inclui glicanas O-ligadas e N-ligadas. Glicanas O-ligadas em PSGL-Ig incluem estruturas sialiladas e/ou fucosiladas. Para uma revisão de modificações pós-traducionais de PSGL e seu significado biológico vide Liu et al, Journal of Biological Chemistry 273: 7078-7087 (1998).

B. Otimização de Formulação de PSGL-Ig

25 PSGL-Ig foi purificado sobre uma coluna QAE e formulada em torno de 25 µg/ml em PBS-CMF ou "His/Suc/Gly" (10 mM de histidina, 260 mM de glicina, 1% de sacarose). As amostras foram processadas sem polissorbato-80, com polissorbato-80 adicionado a 0,005% antes de ciclos de congelamento/descongelamento e com polissorbato-80 adicionado a 0,005% após ciclos de congelamento/descongelamento, mas antes de medição de HMW (para PBS-CMF apenas). As amostras foram submetidas a 20 ciclos de congelamento/descongelamento. O percentual de espécies de elevado

peso molecular (HMW) foi determinado antes e após ciclos de congelamento/descongela-
mentos através de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)-HPLC. Conforme mostrado na Tabela 1, polissorbato-80 reduziu sig-
nificativamente o acúmulo de HMW em PBS-CMF e His/Suc/Gly, mas ape-
5 nas quando adicionado antes de ciclos de congelamento/descongelamento.

Tabela 1. Otimização de Formulação de PSGL-Ig

Tampão	Adição de polissorbato	% HMW no Tempo Zero	% de HMW após 20X congelamento/descongelamento
PBS-CMF	Nenhum	4,25	46,52
PBS-CMF	Spiked em pós-C/D	5,28	44,18
PBS-CMF	0,005%	4,18	4,86
His/Suc/Gly	0,005%	4,39	3,37
His/Suc/Gly	nenhum		42,97

Para determinar a contribuição do agente de tamponamento e pH para a estabilidade da PSGL-Ig, PSGL-Ig foi formulada em torno de 50 µg/ml em tampão a 15 mM apenas (sem excipientes adicionais). Cinco tam-
10 pões (succinato, citrato, histidina, fosfato e Tris) foram testados em um total de 7 pH's (vide Tabela 2). As amostras foram submetidas a 5 ciclos de congelamento/descongelamento. O percentual de HMW foi determinado antes e após ciclos de congelamento/descongelamento através de SEC-HPLC. Con-
forme mostrado na Tabela 2, citrato e histidina resultaram em alterações mí-
15 nimas no percentual de HMW após congelamento/descongelamento, enquanto que Tris, fosfato e succinato resultaram em maiores aumentos no percentual de HMW.

Tabela 2. Efeito do pH da Formulação de PSGL-Ig sobre o Acúmulo de HMW

Tampão	pH	Aumento em HMW
Succinato	5,44	11,7%
Citrato	5,94	1,8%
citrato	6,52	1,4%
Histidina	6,67	2,7%
Fosfato	7,02	6,6%
Fosfato	7,58	3,1%
Tris	7,51	3,5%

C. Estabilidade a Longo Prazo de Formulação de PSGL-Ig

PSGL-Ig purificada foi trocada em 1% de sacarose, 260 mM de glicina, 10 mM de NaCl e 10 mM de histidina, pH de 6,5-6,6 a 5 mg/ml. Polissorbato-80 foi adicionado para uma concentração final de 0,005%. Alíquotas de 1 ml foram enchidas em frascos tubulares de vidro do Tipo I de 2 ml e tampadas. As amostras foram liofilizadas e armazenadas a 5°C, 25°C ou 40°C ou armazenadas como um líquido congelado a -80°C. A estabilidade da proteína foi avaliada através da formação de HMW, grau de hipossulfatação, atividade biológica medida em unidades de ligação relativa (RBU) e grau de ciclização das glutaminas N-terminais em ácido piro-glutâmico. Amostras no tempo zero consistiam em formulações pré- e pós-liofilização. As amostras também foram analisadas após 3 ou 7,5 meses de armazenamento nas temperaturas listadas acima. Conforme mostrado na Tabela 3, as formulações liofilizadas e líquidas congeladas são estáveis sob as condições testadas.

Tabela 3: Estabilidade de formulação de PSGL-Ig

HMW através de SEC (como área %)				
Temperatura	Líquida	Lio, tempo zero	3 meses	7,5 meses
	0,53	0,52		
-80°C				0,63
5°C			0,27	0,52
25°C			0,39	0,71
40°C			0,38	
RBU (atividade biológica)				
Temperatura	Líquida	Lio, tempo zero	3 meses	7,5 meses
	0,99	1,1		
-80°C				0,81
5°C			1,6	0,85
25°C			1,3	0,96
40°C			1,2	
Proporção Q-Q/<Q-<Q (completamente não ciclizado a completamente ciclizado)				

HMW através de SEC (como área %)				
Temperatura	Líquida	Lio, tempo zero	3 meses	7,5 meses
	1,68	1,64		
-80°C				nd
5°C			1,67	1,78
25°C			1,64	1,72
40°C			1,56	
Hipossulfatação (através de AEX)				
Temperatura				% hipossulfato a 7,5 meses
-80°C				1,06
5°C				1,00
25°C				1,00

Exemplo 2: formulação de GP1b-Ig

A. Base de GP1b-Ig

GP1b-alfa é um receptor expresso por plaquetas. O principal ligante para GP1b-alfa é Fator de von Willebrand (VWF). GP1b-Ig é uma proteína de fusão compreendendo o domínio de ligação a ligante de 290 aminoácidos N-terminal solúvel de GP1b-1alfa ligado a 225 aminoácidos de uma Fc de IgG₁ humana inativada, conforme descrito na Publicação PCT Número WO 02/063003. O domínio de ligação a VWF de GP1b-Ig compreende duas mutações de ganho de função, M239V e G233V, as quais intensificam sua afinidade de ligação ao VWF. Focalização isoelétrica (IEF) de GP1b-Ig mostra bandas predominantes dentro de uma faixa de pH de 4,1 a 5,6, agrupadas em torno de um pI de aproximadamente 5. Modificações pós-traducionais da GP1b-Ig incluem glicosilação N-ligada. Glicanas N-ligadas em GP1b-Ig incluem estruturas sialiladas e/ou fucosiladas.

B. Otimização de formulação de GP1b-Ig

O efeito do polissorbato-80 sobre a estabilidade de GP1b-Ig foi avaliada em frascos de polipropileno de 2 ml. GP1b-Ig foi formulada em 2 mg/ml em Tris a 20 mM, pH de 7,2, 50 mM de NaCl e concentrações variadas de polissorbato-80 (0%, 0,005%, 0,01% ou 0,02%). Os frascos foram

congelados através de submersão em nitrogênio líquido durante 1 minuto e descongelados através de incubação em um banho de água a 20°C até que nenhum gelo restasse. As amostras foram submetidas a 14 ciclos de congelamento/descongelamento, com alíquotas extraídas para análise a cada ciclo sim, ciclo não. O percentual de HMW foi determinado através de SEC-HPLC. A recuperação de proteína foi avaliada através de integração da área de picos de proteína sobre um sinal de absorbância a 280 nm. Conforme mostrado na Figura 1, a adição de polissorbato-80 reduziu significativamente o acúmulo de HMW.

O efeito da glicina sobre a estabilidade de GP1b-Ig foi avaliada de uma maneira similar. GP1b-Ig foi formulada a 5 mg/ml em 10 mM de histidina, pH de 6,5, 25 mM de NaCl, 0,9% de sacarose, 0,01% de polissorbato-80 e concentrações variadas de glicina (0%, 1,0%, 1,8%, 2,0% ou 4,0% peso/v). Os frascos foram congelados através de submersão em nitrogênio líquido durante 1 minuto e descongelados através de incubação em um banho de água a 20°C até que nenhum gelo restasse. As amostras foram submetidas a 10 ciclos de congelamento/descongelamento, com alíquotas extraídas para análise a cada ciclo sim, ciclo não. O percentual de HMW foi determinado através de SEC-HPLC. Conforme mostrado na Tabela 4, a adição de 1,8% de glicina minimizou o acúmulo de HMW após 6, 8 ou 10 ciclos de congelamento/descongelamento.

Tabela 4: Efeito da Concentração de Glicina sobre o % de HMW em Formulações de GP1b-Ig

% de glicina	Número de ciclos de congelamento/descongelamento					
	0	2	4	6	8	10
0	0,35	0,41	0,37	0,44	0,47	0,52
1	0,37	0,36	0,4	0,44	0,46	0,47
1,8	0,38	0,39	0,38	0,4	0,42	0,46
2	0,35	0,39	0,37	0,42	0,44	0,48
4	0,4	0,38	0,41	0,45	0,52	0,59

O efeito do pH sobre a estabilidade GP1b-Ig foi avaliado de maneira similar. GP1b-Ig foi formulada a 1 mg/ml em 20 mM de fosfato de sódio

em níveis variados de pH (5,0, 6,0, 7,0 ou 8,0). Os frascos foram congelados através de submersão em nitrogênio líquido durante 1 minuto e descongelados através de incubação em um banho de água a 20°C até que nenhum gelo restasse. As amostras foram submetidas a 10 ciclos de congelamento/descongelamento, com alíquotas extraídas para análise após cada ciclo sim, ciclo não. O percentual de HMW foi determinado através de SEC-HPLC e a recuperação de proteína foi monitorada pelo sinal de detecção de HPLC a 280 e 214 nm. Após 10 ciclos, amostras em um pH de 5,0 e 6,0 se tornaram turvas, uma indicação de declínio de recuperação de proteína solúvel. Conforme mostrado na Tabela 5, formulação em um pH de 5,0 ou 6,0 leva a um acúmulo aumentado de HMW e recuperação diminuída de proteína.

Tabela 5: Efeito do pH sobre o % de HMW e Recuperação de Proteína em Formulações de GP1b-Ig

	pH	Número de ciclos de congelamento/descongelamento					
		0	2	4	6	8	10
% HMW	5,0	4,62	9,55	12,02	14,45	19,33	24,94
	6,0	3,96	8,63	12,33	15,93	20,64	24,94
	7,0	4,44	6,53	8,6	10,17	12,02	13,67
	8,0	4,69	6,32	7,48	8,79	10,31	11,77
Recuperação de proteína	5,0	9,10E+05	8,30E+05	7,38E+05	6,17E+05	5,03E+05	4,06E+05
	6,0	8,93E+05	8,69E+05	8,26E+05	7,96E+05	7,63E+05	7,37E+05
	7,0	9,23E+05	9,12E+05	9,00E+05	8,88E+05	8,77E+05	8,60E+05
	8,0	9,37E+05	9,32E+05	9,28E+05	9,11E+05	9,00E+05	8,91E+05

O efeito da concentração de proteína sobre a estabilidade de GP1b-Ig foi avaliada em garrafas de 20 ml, enchidas até metade com 0,25, 10 ou 19 mg/ml de GP1b-Ig em 10 mM de histidina, pH de 6,5, 1,8% de glicina, 25 mM de NaCl, 0,9% de sacarose e 0,01% de polissorbato-80. As garrafas foram congeladas através de submersão em nitrogênio líquido durante 10 minutos e descongeladas através de incubação em um banho de água a 25°C durante 15-20 minutos. As amostras foram submetidas a 10 ciclos de congelamento/descongelamento, com alíquotas removidas para análise após 0, 1, 2, 4, 6, 8 e 10 ciclos. Antes de análise, a concentração de proteína

em todas as amostras foi normalizada através de diluição para 0,25 mg/ml em uma formulação de outro modo idêntica. O percentual de HMW foi determinado através de SEC-HPLC. Conforme mostrado na Tabela 6, a GP1b-Ig é estável sobre uma ampla faixa de concentrações nessa formulação.

- 5 **Tabela 6:** Efeito da Concentração de Proteína sobre o % de HMW em Formulações de GP1b-Ig

[GP1b-Ig], em mg/ml	Número de ciclos de congelamento/descongelamento					
	0	2	4	6	8	10
19	0,62	0,67	0,42	0,54	0,56	0,59
10		0,58	0,51	0,40	0,55	0,32
0,25		0,42	0,40	0,36	0,35	0,46

C. Estabilidade a Longo Prazo de Formulação de GP1b-Ig

- 10 GP1b-Ig purificada foi armazenada a -80°C até descongelada para uso. A concentração de proteína foi estimada como fosse de 19 mg/ml através de A280. A GP1b-Ig foi formulada em 10 mg/ml em 10 mM de histidina, pH de 6,5, 1,8% de glicina, 25 mM de NaCl, 0,9% de sacarose e 0,01% de polissorbato-80 através de diluição na solução de estoque apropriada. A formulação resultante foi filtrada através de uma unidade de filtro de 0,2 μm e distribuída em frascos de vidro. Os frascos foram colocados sobre
- 15 bandejas de aço e liofilizados. Liofilização foi realizada de acordo com os parâmetros de ciclo resumidos na Tabela 7.

Tabela 7. Ciclo de Liofilização de GP1b-Ig

Temp ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (horas)	Elevação (horas)	Pressão (mT)
5	13,5	1,8	
-50	4	1,2	
-15	6	0,8	
-40	1,5	0,5	50 (última hora apenas)
-25	35,3	4,6	50
30	6		50
Horas totais	75,2		

Quando de término do ciclo, a câmara de liofilização foi reenchida com nitrogênio seco, após o que as rolhas foram descomprimidas e o

restante do vácuo liberado. Os frascos foram imediatamente vedados, rotulados e armazenados a 2-8°C, 25°C ou 40°C.

Em cada ponto de tempo (0, 1, 2, 3, 4, 6, 9 e 12 meses), um ou mais frascos de liofilização foram abertos. As tortas de produto foram avaliadas com relação à aparência e umidade residual foi determinada através de titulação de Karl-Fisher. As tortas foram, então, reconstituídas com 1 ml de água para injeção (WFI), monitoramento com relação à aparência e tempo de reconstituição. Após reconstituição, o pH foi medido através de imersão do eletrodo em um frasco de 2 ml contendo 400 µg/ml da formulação. A solução restante foi dividida em alíquotas de 3 x 200 µl, duas das quais foram congeladas a -80°C e uma das quais foi designada para análise e mantida a 2-8°C.

As formulações de GP1b-Ig reconstituídas foram diluídas 10 vezes na mesma solução para proporcionar, teoricamente, uma solução a 1 mg/ml. As concentrações reais de proteína foram medidas através de espectroscopia por UV usando lâminas com 96 cavidades transparentes ao UV. A concentração de proteína foi calculada através da formulação: concentração (em mg/ml) = fator de diluição x (A280-A320)/(1,1).

A atividade biológica foi ensaiada como grau de ligação de GP1b-Ig ao VWF humano derivado de plasma. A concentração de proteína medida foi usada para calcular a atividade específica em unidades/µg.

O acúmulo de HMW foi medido através de SEC-HPLC e foi expresso como um percentual de espécies totais.

O acúmulo de espécies de baixo peso molecular (LMW) foi monitorado através de (RP)-HPLC de fase reversa e expresso como percentual de espécies totais.

A distribuição de isoformas sulfatadas foi determinada através de cromatografia de troca de ânions (AEX).

Conforme mostrado nas Tabelas 8 a 10, esses ensaios demonstram que essa formulação de GP1b-Ig é estável sob as condições testadas durante pelo menos 9 meses. A Tabela 8 mostra os resultados obtidos após armazenamento a 2-8°C. A Tabela 9 mostra os resultados obtidos após armazenamento a 25°C. A Tabela 10 mostra os resultados obtidos após arma-

zenamento a 40°C.

Tabela 8: Estabilidade da Formulação de GP1b-Ig a 2-8°C

	Aparência	pH	Conc. proteína (mg/ml)	% umidade residual	Atividade de ligação a VWF	% HMW	% LMW	Sulfatação
Especificação	Antes de reconstituição: torta branca essencialmente isenta de partículas. Após reconstituição: solução essencialmente isenta de partículas	6,0 a 7,0	10 mg/ml	Reportar resultado	$5,0 \times 10^4$ – $5,8 \times 10^5$ unidades/ μ g de GP1b-Ig	$\leq 6\%$	$\leq 12\%$	
Inicial	Vai de encontro à especificação	6,68	9,99	0,34	$9,4 \times 10^4$	0,35	2,35	4,90
1 mês	Vai de encontro à especificação	N/A	9,60	0,41	$8,21 \times 10^4$	0,46	2,82	4,93
2 meses	Vai de encontro à especificação	N/A	8,47	0,54	$7,28 \times 10^4$	0,38	2,40	4,88
3 meses	Vai de encontro à especificação	N/A	9,62	0,60	$7,53 \times 10^4$	0,45	2,19	4,87
4 meses	Vai de encontro à especificação	6,38	9,72	0,35	$1,05 \times 10^5$	0,32	2,17	4,88
6 meses	Vai de encontro à especificação	6,65	9,93	0,53	$1,01 \times 10^5$	0,37	2,49	4,42
9 meses	Vai de encontro à especificação	6,65	9,64	0,84	$1,07 \times 10^5$	0,48	2,44	4,89
12 meses	Vai de encontro à especificação	6,60	9,97	0,83	$1,04 \times 10^5$	0,48	2,47	4,88

Tabela 9: Estabilidade da Formulação de GP1b-Ig a 25°C

	Aparência	pH	Conc. proteína (mg/ml)	% umidade residual	Atividade de ligação a VWF	% HM W	% LM W	Sulfatação
Especificação	Antes de reconstituição: torta branca essencialmente isenta de partículas. Após reconstituição: solução essencialmente isenta de partículas	6,0 a 7,0	10 mg/ml	Reportar resultado	$5,0 \times 10^4$ – $5,8 \times 10^5$ unidades/ μ g de GP1b-Ig	$\leq 6\%$	$\leq 12\%$	
Inicial	Vai de encontro à especificação	6,68	9,99	0,34	$9,4 \times 10^4$	0,35	2,35	4,90
1 mês	Vai de encontro à especificação	N/A	9,42	0,92	$8,09 \times 10^4$	0,53	2,82	4,93
2 meses	Vai de encontro à especificação	N/A	8,85	0,89	$7,44 \times 10^4$	0,46	2,43	4,89
3 meses	Vai de encontro à especificação	N/A	9,67	1,24	$8,36 \times 10^4$	0,56	2,22	4,86
4 meses	Vai de encontro à especificação	6,38	9,62	N/A	$1,21 \times 10^5$	0,47	2,42	4,86
6 meses	Vai de encontro à especificação	6,65	9,49	1,77	$1,03 \times 10^5$	0,59	2,41	4,89
9 meses	Vai de encontro à especificação	6,64	9,50	1,90	$1,15 \times 10^5$	0,69	2,42	4,89
12 meses	Vai de encontro à especificação	6,60	10,09	1,40	$9,82 \times 10^5$	0,67	2,45	4,88

Tabela 10: Estabilidade da Formulação de GP1b-Ig a 40°C

	Aparência	pH	Conc. proteína (mg/ml)	% umidade residual	Atividade de ligação a VWF	% HM W	% LMW	Sulfatação
Especificação	Antes de reconstituição: torta branca essencialmente isenta de partículas. Após reconstituição: solução essencialmente isenta de partículas	6,0 a 7,0	10 mg/ml	Reportar resultado	$5,0 \times 10^4$ – $5,8 \times 10^5$ unidades/ μ g de GP1b-Ig	$\leq 6\%$	$\leq 12\%$	
Inicial	Vai de encontro à especificação	6,68	9,99	0,34	$9,4 \times 10^4$	0,35	2,35	4,90
1 mês	Vai de encontro à especificação	N/A	9,44	1,62	$7,60 \times 10^4$	0,68	2,71	4,93
2 meses	Vai de encontro à especificação	N/A	8,42	1,32	$7,91 \times 10^4$	0,64	2,37	4,89
3 meses	Vai de encontro à especificação	N/A	9,65	1,37	$7,54 \times 10^4$	0,78	2,21	4,86
4 meses	Vai de encontro à especificação	6,38	8,79	1,38	$9,49 \times 10^5$	0,79	2,42	4,86
6 meses	Vai de encontro à especificação	6,65	9,13	2,89	$9,95 \times 10^5$	1,12	2,41	4,89
9 meses	Vai de encontro à especificação	6,64	9,60	3,18	$1,11 \times 10^5$	1,49	2,57	4,90
12 meses	Vai de encontro à especificação	6,60	9,74	4,46	$9,42 \times 10^5$	1,75	2,55	4,88

Exemplo 3: Formulação de IL-13R-Ig**A. Base de IL-13R-Ig**

IL-13R-Ig é o principal receptor para interleucina-13 (IL-13). IL-13R-Ig é uma proteína de fusão compreendendo o domínio extracelular solúvel de IL-13R α 2 ligado a uma seqüência espaçadora e as regiões de dobradiça, CH2 e CH3 da IgG₁ humana, conforme descrito na Patente U.S. 6.286.480. Focalização isoeétrica (IEF) de IL-13R-Ig mostra bandas predominantes dentro de uma faixa de pH de 3,8 a 4,7, agrupadas em torno de um pI de aproximadamente 4,3. Modificações pós-traducionais de IL-13R-Ig incluem glicosilação N-ligada. Glicanas N-ligadas em IL-13R-Ig incluem estruturas sialiladas.

B. Otimização de Formulação de IL-13R-Ig

IL-13R-Ig foi formulada a 10 mg/ml em quatro diferentes formulações: NaPO₄ a 10 mM, 0,01% de polissorbato-80, 1% de sacarose e 2% de manitol, pH de 7,4; NaPO₄ a 10 mM, 0,01% de polissorbato-80, 1% de sacarose e 1,8% de glicina, pH de 7,4; Tris a 10 mM, 0,01% de polissorbato-80, 1% de sacarose e 2% de manitol, pH de 7,4; ou Tris a 10 mM, 0,01% de polissorbato-80, 0,9% de sacarose e 1,8% de glicina, pH de 7,4. Os frascos liofilizados foram armazenados durante até 12 meses a 4°C, 25°C e 40°C. Em cada ponto de tempo, um ou mais frascos de cada formulação e combinação de temperatura foram reconstituídos e ensaiados com relação à recuperação de proteína (através de A280 ou SEC), acúmulo de HMW (através de SEC-HPLC) ou atividade biológica (através da IC₅₀ em um ensaio para inibição de proliferação de uma linhagem de célula IL-13-dependente). A Tabela 11 mostra a recuperação percentual de proteína, conforme ensaiado através de A280, para cada formulação e temperatura após 12 semanas em armazenamento. A Tabela 12 mostra a recuperação percentual de proteína, conforme ensaiado através de SEC, para cada formulação e temperatura após 12 semanas de armazenamento. A Tabela 13 mostra o acúmulo percentual de HMW, conforme ensaiado através de SEC-HPLC, para cada combinação de formulação (das quatro listadas acima), temperatura (a 4°C, 25°C ou 40°C) e tempo de armazenamento (0, 1 mês, 7 semanas ou 12 semanas), bem como o material de iniciação pós-liofilização. a Tabela 14 mostra os dados de IC₅₀ para cada formulação após 4 semanas (a 2-8°C ou 25°C), 7 semanas (a 2-8°C ou 25°C) ou 12 semanas (a 2-8°C, 25°C ou 40°C), bem como o material de iniciação pós-liofilização.

Tabela 11: Efeito da Formulação de IL-13R-Ig sobre o % de Recuperação de proteína (através de A280) a 12 semanas

Formulação	Temperatura		
	4°C	25°C	40°C
Tris a 10 mM, 0,01% de polissorbato-80, 1% de sacarose e 2% de manitol, pH de 7,4	96,21	94,30	90,18
NaPO ₄ a 10 mM, 0,01% de polissorbato-80, 1% de sacarose e 2% de manitol, pH de 7,4	95,89	106,54	95,37
Tris a 10 mM, 0,01% de polissorbato-80, 0,9% de sacarose e 1,8% de glicina, pH de 7,4	99,08	104,65	104,08
NaPO ₄ a 10 mM, 0,01% de polissorbato-80, 0,9% de sacarose e 1,8% de glicina, pH de 7,4	108,38	105,26	108,06

Tabela 12: Efeito da Formulação de IL-13R-Ig sobre o % de Recuperação de proteína (através de SEC) a 12 semanas

Formulação	Temperatura		
	4°C	25°C	40°C
Tris a 10 mM, 0,01% de polissorbato-80, 1% de sacarose e 2% de manitol, pH de 7,4	94	95	89
NaPO ₄ a 10 mM, 0,01% de polissorbato-80, 1% de sacarose e 2% de manitol, pH de 7,4	93	104	91
Tris a 10 mM, 0,01% de polissorbato-80, 0,9% de sacarose e 1,8% de glicina, pH de 7,4	100	105	104
NaPO ₄ a 10 mM, 0,01% de polissorbato-80, 0,9% de sacarose e 1,8% de glicina, pH de 7,4	104	100	102

Tabela 13: Efeito da Formulação de IL-13R-Ig sobre o % de HMW (através de SEC)

Formulação	Pós-lío	4°C			25°C			40°C		
		4 s	7 s	12 s	4 s	7 s	12 s	4 s	7 s	12 s
Tris a 10 mM, 0,01% de polissorbato-80, 1% de sacarose e 2% de manitol, pH de 7,4	1,87	1,84	2,28	1,49	2,19	2,82	2,00	2,68	3,71	2,88
NaPO ₄ a 10 mM, 0,01% de polissorbato-80, 1% de sacarose e 2% de manitol, pH de 7,4	3,02	2,34	2,91	2,03	2,91	3,89	2,97	3,57	5,34	4,57
Tris a 10 mM, 0,01% de polissorbato-80, 0,9% de sacarose e 1,8% de glicina, pH de 7,4	2,18	1,86	2,33	1,62	2,24	2,80	2,04	2,57	3,79	3,04
NaPO ₄ a 10 mM, 0,01% de polissorbato-80, 0,9% de sacarose e 1,8% de glicina, pH de 7,4	2,91	2,56	3,22	2,31	2,88	4,10	3,03	3,90	5,87	4,97

Tabela 14: Efeito da Formulação de IL-13R-Ig sobre a bioatividade (IC₅₀ em pM)

Formulação	Pós-lío	4 semanas		7 semanas		12 semanas		
		2-8°C	25°C	2-8°C	25°C	2-8°C	25°C	40°C
Tris a 10 mM, 0,01% de polissorbato-80, 1% de sacarose e 2% de manitol, pH de 7,4	863	539	672	727	1034	ND	ND	ND
NaPO ₄ a 10 mM, 0,01% de polissorbato-80, 1% de sacarose e 2% de manitol, pH de 7,4	1014	904	637	632	818	629	865	674
Tris a 10 mM, 0,01% de polissorbato-80, 0,9% de sacarose e 1,8% de glicina, pH de 7,4	730	600	791	849	602	ND	ND	ND
NaPO ₄ a 10 mM, 0,01% de polissorbato-80, 0,9% de sacarose e 1,8% de glicina, pH de 7,4	625	680	660	704	845	849	652	762

C. Estabilidade a Longo Prazo de formulação de IL-13R-Ig

IL-13R purificado foi formulado a 10 mg/ml em 1% de sacarose, 2% de manitol, NaCl a 40 mM, 0,01% de polissorbato-80 e Tris a 10 mM, pH de 7,4. Frascos tubulares de 5 ml foram enchidos com 1 ml cada da formulação e liofilizada em um secador de revelação Lyo-Star®. Frascos liofilizados foram armazenados a 2-8°C, 25°C ou 40°C durante até 24 horas, com amostras, com amostras analisadas a 0, 4, 7, 12 e 24 semanas. As amostras foram ensaiadas com relação à aparência (antes e após reconstituição), pH, concentração de proteína (através de A280), HMW (através de SEC-HPLC) e bioatividade (IC₅₀).

Conforme mostrado nas Tabelas 15-17, a formulação de IL-13R-Ig é estável sob condições testadas durante pelo menos 24 semanas. A Tabela 15 mostra os resultados obtidos após armazenamento a 2-8°C. A Tabela 16 mostra os resultados obtidos após armazenamento a 25°C. A Tabela 17 mostra os resultados obtidos após armazenamento a 40°C.

15 Tabela 15: Estabilidade de Formulação de IL-13R-Ig a 2-8°C

	Aparência (antes de reconstituição)	Aparência (após reconstituição)	pH	Conc. de proteína	% HMW	IC ₅₀
Especificação	Torta branca, essencialmente isenta de matéria em partículas francamente visível, úmida e defeitos no recipiente/vedação	Solução, essencialmente isenta de matéria em partículas francamente visível	6,9-7,9	Reportar resultados (alvo: 10 mg/ml)	≤ 10% HWM	≤ 2200 pM
Inicial	Vai de encontro à especificação	Vai de encontro à especificação	7,37	10,58	4,76%	411 pM
4 semanas	Vai de encontro à especificação	Vai de encontro à especificação	7,36	10,33	5,34%	471 pM
7 semanas	Vai de encontro à especificação	Vai de encontro à especificação	7,38	9,48	4,18%	429 pM
12 semanas	Vai de encontro à especificação	Vai de encontro à especificação	7,38	9,96	3,19%	467 pM
24 semanas	Vai de encontro à especificação	Vai de encontro à especificação	7,42	10,0	4,03%	890 ± 239 pM (10 réplicas)

Tabela 16: Estabilidade de Formulação de IL-13R-Ig a 25°C

	Aparência (antes de reconstituição)	Aparência (após reconstituição)	pH	Conc. de proteína	% HMW	IC ₅₀
Especificação	Torta branca, essencialmente isenta de matéria em partículas francamente visível, úmida e defeitos no recipiente/vedação	Solução, essencialmente isenta de matéria em partículas francamente visível	6,9-7,9	Repor-tar resultados (alvo: 10 mg/ml)	≤ 10% HWM	≤ 2200 pM
Inicial	Vai de encontro à especificação	Vai de encontro à especificação	7,37	10,58	4,76%	411 pM
4 semanas	Vai de encontro à especificação	Vai de encontro à especificação	7,36	11,09	5,81%	445 pM
7 semanas	Vai de encontro à especificação	Vai de encontro à especificação	7,40	9,26	4,43%	336 pM
12 semanas	Vai de encontro à especificação	Vai de encontro à especificação	7,42	10,2	3,37%	261 pM
24 semanas	Vai de encontro à especificação	Vai de encontro à especificação	7,37	10,09	4,21%	966 ± 314 pM (4 réplicas)

Tabela 17: Estabilidade de Formulação de IL-13R-Ig a 40°C

	Aparência (antes de reconstituição)	Aparência (após reconstituição)	pH	Conc. de proteína	% HMW	IC ₅₀
Especificação	Torta branca, essencialmente isenta de matéria em partículas francamente visível, úmida e defeitos no recipiente/vedação	Solução, essencialmente isenta de matéria em partículas francamente visível	6,9-7,9	Reportar resultados (alvo: 10 mg/ml)	≤ 10% HWM	≤ 2200 pM
Inicial	Vai de encontro à especificação	Vai de encontro à especificação	7,37	10,58	4,76%	411 pM
4 semanas	Vai de encontro à especificação	Vai de encontro à especificação	7,36	10,81	6,02%	ND
7 semanas	Vai de encontro à especificação	Vai de encontro à especificação	7,40	10,24	4,88%	ND
12 semanas	Vai de encontro à especificação	Vai de encontro à especificação	7,39	9,60	3,65%	469 pM
24 semanas	Vai de encontro à especificação	Vai de encontro à especificação	7,4	10,44	4,85%	823 ± 299 pM (10 réplicas)

- As modalidades dentro do relatório descritivo proporcionam uma ilustração de modalidades da invenção e não deverão ser construídas como limitando o escopo da invenção. aqueles versados na técnica reconhecerão prontamente que muitas outras modalidades são abrangidas pela invenção.
- 5 Todas as publicações e patentes citadas no presente relatório descritivo são incorporadas por referência em sua totalidade. Até o ponto em que o material incorporado por referência contradiz ou é inconsistente com o presente relatório descritivo, o relatório prevalecerá sobre qualquer um de tais materiais. A citação de quaisquer referências aqui não é uma admissão de que tais
- 10 referências são a técnica anterior à presente invenção. A menos que de outro modo estabelecido, todos os percentuais se referem à quantidades em peso/peso.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica compreendendo:
 - a) uma proteína de fusão de Ig tendo um pI de menos de 6,
 - b) glicina,
 - 5 c) um dissacarídeo,
 - d) um tensoativo e
 - e) um tampão;em que a composição contém 0,5 a 5% de glicina, 0,5 a 5% de dissacarídeo e 0,001 a 0,5% de tensoativo.
- 10 2. Composição de acordo com a reivindicação 1, ainda compreendendo NaCl em uma concentração de NaCl de 1-200 mM.
3. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, em que a concentração de fusão de Ig na composição é 0,025 a 60 mg/ml.
- 15 4. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a proteína de fusão de IL-13R-Ig tem um pI de menos de 4.
5. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que a proteína de fusão de Ig compreende uma porção de não-Ig a qual é derivada de um receptor.
- 20 6. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que a proteína de fusão de Ig compreende uma porção de não-Ig que é sulfatada, fosforilada ou glicosilada.
7. Composição de acordo com a reivindicação 6, em que a porção de não-Ig glicosilada é sialilada ou fucosilada.
- 25 8. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que a proteína de fusão de Ig é IL-13R-Ig ou IL-21R-Ig.
9. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que a proteína de fusão de Ig é PSGL-Ig ou GP1b-Ig.
10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que o dissacarídeo é sacarose ou trealose.
- 30 11. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que o tensoativo é polissorbato.

12. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, em que a concentração de tampão na composição é 5 a 30 mM.

5 13. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, em que o tampão é um tampão de histidina, um tampão de tris ou um tampão de fosfato.

14. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, em que a composição não contém NaCl.

10 15. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, em que a composição foi liofilizada.

16. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, em que a composição é estável a -80°C a $+40^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos uma semana.

15 17. Composição de acordo com a reivindicação 15, em que a composição foi reconstituída.

18. Composição farmacêutica compreendendo:

- 20 a) uma proteína de fusão de Ig tendo um pI de menos de 6,
b) manitol,
c) um dissacarídeo,
d) um tensoativo,
e) um tampão

e em que a composição contém 0,5 a 5% de manitol, 0,5 a 5% de dissacarídeo, 0,001 a 0,5% de tensoativo e menos de 35 mM de NaCl.

25 19. Composição de acordo com a reivindicação 18, em que a concentração da fusão de Ig é 0,025 a 60 mg/ml.

20. Composição de acordo com a reivindicação 18 ou a reivindicação 19, em que a proteína de fusão de Ig tem um pI de menos de 4.

30 21. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 20, em que a proteína de fusão de Ig compreende uma porção de não-Ig a qual é derivada de um receptor.

22. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 21, em que a proteína de fusão de Ig compreende uma porção de

não-Ig que é sulfatada, fosforilada ou glicosilada.

23. Composição de acordo com a reivindicação 22, em que a porção de não-Ig glicosilada é sialilada ou fucosilada.

24. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 23, em que a proteína de fusão Ig é IL-13R-Ig ou IL-21R-Ig.

25. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 23, em que a proteína de fusão de Ig é PSGL-Ig ou GP1b-Ig.

26. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 25, em que o dissacarídeo é sacarose ou trealose.

27. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 26, em que o tensoativo é polissorbato.

28. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 27, em que a concentração de tampão na composição é 5 a 30 mM.

29. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 28, em que o tampão é um tampão de histidina, um tampão de tris ou um tampão de fosfato.

30. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 29, em que a composição não contém NaCl.

31. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 30, em que a composição foi liofilizada.

32. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 31, em que a composição é estável a -80°C a $+40^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 1 semana.

33. Composição de acordo com a reivindicação 31, em que a composição foi reconstituída.

34. Composição farmacêutica consistindo essencialmente em 0,025 a 60 mg/ml de proteína de fusão de Ig ácida, de 1 a 4% de glicina, de 0,5 a 2% de dissacarídeo, de 0,005 a 0,2% de tensoativo, de 1 a 40 mM de tampão e opcionalmente de 1-200 mM de NaCl.

35. Composição farmacêutica consistindo essencialmente em 0,025 a 60 mg/ml de outra proteína de fusão de Ig ácida que não PSGL-Ig

ou IL-13R-Ig, de 1 a 4% de manitol, de 0,5 a 2% de dissacarídeo, de 0,005 a 0,2% de tensoativo, de 1 a 40 mM de tampão e opcionalmente de 1-200 mM de NaCl.

36. Composição farmacêutica consistindo essencialmente em
5 0,025 a 60 mg/ml de proteína de fusão de Ig ácida, de 1 a 4% de manitol, de 0,5 a 2% de dissacarídeo, de 0,005 a 0,2% de tensoativo e de 1 a 40 mM de tampão.

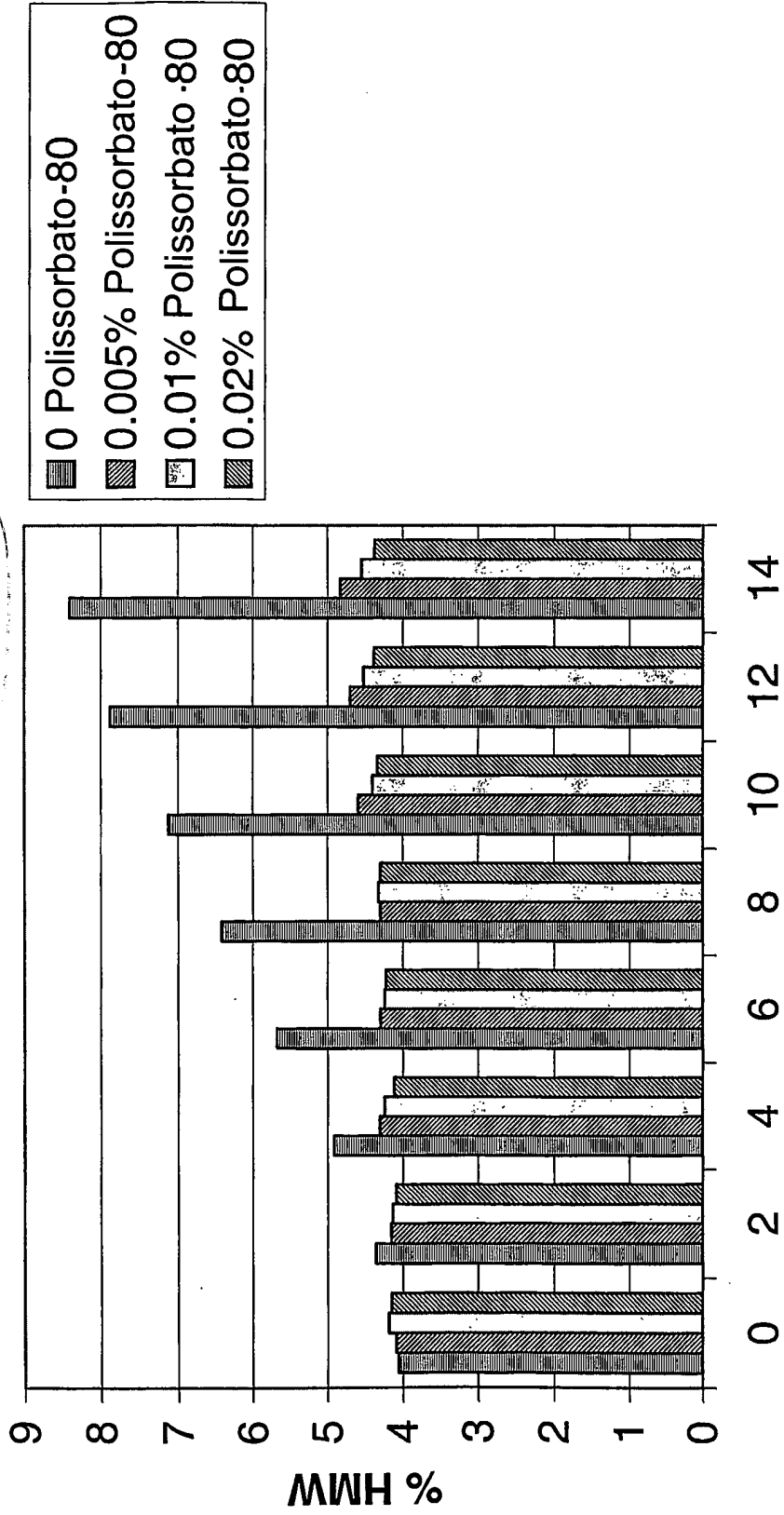
37. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 18 e 34 a 36, em que a composição foi liofilizada através de um processo que inclui uma etapa de anelamento.
10

38. Método de fabricação da composição como definida na reivindicação 37, no qual a etapa de anelamento promove cristalização do agente de composição de volume mantendo a composição em uma temperatura acima da temperatura de congelamento final durante um período de
15 tempo definido.

39. Método de fabricação da composição de acordo com a reivindicação 38, compreendendo:

- a) congelamento da composição para abaixo de -40°C ;
- b) elevação da temperatura da composição para uma temperatura escolhida da faixa de -5°C a -40°C durante um período de tempo suficiente para promover cristalização de glicina ou manitol na composição;
- c) diminuição da temperatura da composição para abaixo de -35°C ;
- d) estabelecimento de um vácuo; e
- e) secagem da composição em uma temperatura escolhida da
25 faixa de -20°C a $+30^{\circ}\text{C}$.

FIG 1



RESUMO

Patente de Invenção: "FORMULAÇÕES DE PROTEÍNA DE FUSÃO DE IMUNOGLOBULINA".

A presente invenção refere-se a composições de proteínas de fusão de Ig, especialmente composições incluindo uma proteína de fusão de Ig, um agente de composição de volume, um dissacarídeo, um tensoativo e um tampão. Em um aspecto, essas composições são estáveis sob armazenamento a longo prazo ou pelo menos um ciclo de congelamento/descongelamento. A invenção também refere-se a métodos de preparação das composições de proteína de fusão de Ig. Em um aspecto, as composições da invenção são liofilizadas. Em um outro aspecto, as composições são liofilizadas através de um processo que inclui uma etapa de anelamento.