



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112017008125-3 B1

(22) Data do Depósito: 22/10/2015

(45) Data de Concessão: 21/11/2023

(54) Título: MÉTODO PARA A REDUÇÃO DA VISCOSIDADE DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS, FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS, MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE UM PÓ LIOFILIZADO, PÓ LIOFILIZADO E MÉTODO PARA RECONSTITUIÇÃO DE UM PÓ LIOFILIZADO

(51) Int.Cl.: A61K 47/18; A61K 39/395; A61K 9/19.

(30) Prioridade Unionista: 23/10/2014 US 62/067,637.

(73) Titular(es): AMGEN INC..

(72) Inventor(es): CHRISTOPHER JAMES SLOEY; SEKHAR KANAPURAM.

(86) Pedido PCT: PCT US2015056972 de 22/10/2015

(87) Publicação PCT: WO 2016/065181 de 28/04/2016

(85) Data do Início da Fase Nacional: 19/04/2017

(57) Resumo: REDUÇÃO DA VISCOSIDADE DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS. É fornecido um método para redução da viscosidade de uma formulação farmacêutica que utiliza uma concentração de um excipiente para redução da viscosidade selecionado do grupo que consiste em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-prolina e respectivas misturas em combinação com uma proteína terapêutica. É também fornecida uma formulação farmacêutica estável.

**MÉTODO PARA A REDUÇÃO DA VISCOSIDADE DE FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS, FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS, MÉTODO DE
PREPARAÇÃO DE UM PÓ LIOFILIZADO, PÓ LIOFILIZADO E MÉTODO
PARA RECONSTITUIÇÃO DE UM PÓ LIOFILIZADO
REFERÊNCIA CRUZADA COM PEDIDOS RELACIONADOS**

[001] Este pedido reivindica o benefício de U.S. Provisional Application No. 62/067,637 depositado em 23 de outubro de 2014, que é incorporado em sua íntegra para fins de referência.

FUNDAMENTOS

[002] Proteínas farmacêuticamente ativas, tais como anticorpos, são frequentemente formuladas em soluções líquidas, particularmente para injeção parenteral. No caso de produtos que devem ser administrados por uma via subcutânea, por exemplo uso em autoadministração, formulações em volumes de liberação superiores a 1-2 mililitros não são bem toleradas. Nesses casos, formulações proteicas altamente concentradas são desejáveis para satisfazer o volume terapêutico limitado. As exigências dessa administração do tipo dose elevada e pequeno volume significam que o agente terapêutico proteico pode alcançar concentrações superiores a 100 mg/mL ou mais. Formulações proteicas altamente concentradas podem impor muitos desafios à capacidade de fabricação e à administração de agentes terapêuticos à base de proteínas. Um desafio imposto por algumas formulações proteicas altamente concentradas consiste em viscosidade aumentada. Formulações com alta viscosidade são difíceis de manipular durante fabricação, incluindo os estágios de ampliação de volume e preenchimento. Formulações com alta viscosidade são também difíceis de aspirar em uma seringa e injetar, o que torna a administração ao paciente difícil e desagradável. A necessidade de identificar compostos que são úteis para reduzir a viscosidade de formulações proteicas altamente concentradas,

de desenvolver métodos de redução da viscosidade dessas formulações e de fornecer formulações farmacêuticas com viscosidade reduzida é bem conhecida na indústria farmacêutica. A presente invenção fornece tais compostos, métodos e formulações.

RESUMO

[003] É fornecido um excipiente selecionado do grupo que consiste em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e respectivas misturas em concentrações selecionadas para uso na redução da viscosidade de formulações de proteínas. São fornecidos no presente documento métodos para redução da viscosidade de formulações proteicas mediante combinação de uma proteína terapêutica de concentração elevada com uma concentração de um excipiente para redução da viscosidade selecionado do grupo que consiste em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e respectivas misturas. É também fornecido um pó liofilizado compreendendo uma proteína terapêutica e um excipiente selecionado do grupo que consiste em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e respectivas misturas em que o excipiente está presente em uma concentração efetiva em peso:peso para reduzir a viscosidade mediante reconstituição com um diluente. É também fornecido um pó liofilizado compreendendo uma proteína terapêutica e um diluente para reconstituição que contém um excipiente do grupo que consiste em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e respectivas misturas.

[004] É fornecido no presente documento um método para redução da viscosidade de uma formulação farmacêutica líquida compreendendo uma proteína terapêutica em uma

concentração de pelo menos 70 mg/mL, compreendendo a etapa de combinação da proteína terapêutica com uma concentração de um excipiente para redução da viscosidade selecionado do grupo que consiste em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e respectivas misturas. Em uma modalidade, a viscosidade da formulação é reduzida em pelo menos 5%. Em outra modalidade, a viscosidade da formulação é reduzida em pelo menos 10%. Em outra modalidade, a viscosidade da formulação é reduzida em pelo menos 20%. Em outra modalidade, a viscosidade da formulação é reduzida em pelo menos 30%. Em outra modalidade, a viscosidade da formulação é reduzida em pelo menos 40%. Em outra modalidade, a viscosidade da formulação é reduzida em pelo menos 50%. Em outra modalidade, a viscosidade da formulação é reduzida em pelo menos 60%. Em outra modalidade, a viscosidade da formulação é reduzida em pelo menos 70%. Em outra modalidade, a viscosidade da formulação é reduzida em pelo menos 80%. Em uma modalidade relacionada, são fornecidas formulações farmacêuticas produzidas por meio desses métodos.

[005] É também fornecida uma composição farmacêutica compreendendo uma proteína terapêutica em uma concentração de pelo menos 70 mg/mL e um excipiente selecionado do grupo que consiste em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e respectivas misturas. Em uma modalidade, a concentração do excipiente é de cerca de 5 mM a cerca de 700 mM. Em uma modalidade relacionada, a concentração do excipiente é de cerca de 100 mM a cerca de 400 mM. Em outra modalidade relacionada, a concentração do excipiente é de cerca de 200 mM a cerca de 300 mM. Em ainda outra modalidade relacionada, a concentração do excipiente

é de cerca de 140 mM a cerca de 170 mM. São também fornecidas tais composições farmacêuticas com um pH que varia entre cerca de 4,0 a cerca de 8,0. Em uma modalidade relacionada, o pH é de cerca de 4,0 a cerca de 6,0. Em uma modalidade relacionada adicional, o pH é de cerca de 4,8 a cerca de 5,4.

[006] É também fornecido um método de preparação de um pó liofilizado compreendendo a etapa de liofilização de uma formulação farmacêutica conforme descrito anteriormente.

[007] É fornecido no presente documento um pó liofilizado compreendendo uma proteína terapêutica e um excipiente selecionado do grupo que consiste em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e respectivas misturas em que o excipiente está presente em uma concentração efetiva em peso:peso para reduzir a viscosidade mediante reconstituição com um diluente. Em uma modalidade, o excipiente está presente em uma concentração que varia entre cerca de 100 µg por mg da proteína terapêutica a cerca de 1 mg por mg da proteína terapêutica. Em uma modalidade relacionada, o excipiente está presente em uma concentração que varia entre cerca de 200 µg a cerca de 500 µg por mg da proteína terapêutica. Em uma modalidade relacionada adicional, o excipiente está presente em uma concentração que varia entre cerca de 150 µg a cerca de 250 µg por mg da proteína terapêutica. É também fornecido um método para reconstituição de um pó liofilizado conforme descrito anteriormente compreendendo a etapa de adição de um diluente aquoso estéril.

[008] São também fornecidas proteínas terapêuticas que são anticorpos. Também são fornecidas formulações ou

composições conforme descrito anteriormente em que a proteína terapêutica é um anticorpo. Além disso, também é fornecido no presente documento um pó liofilizado conforme descrito anteriormente em que a proteína terapêutica é um anticorpo.

DESCRIÇÃO BREVE DOS DESENHOS

[009] A Figura 1 é um gráfico de barras mostrando os efeitos de vários excipientes sobre a viscosidade de uma solução de anticorpos.

[0010] A Figura 2 é um gráfico de barras mostrando os efeitos de vários excipientes sobre a viscosidade de uma solução de anticorpos.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0011] A redução da viscosidade de formulações de proteínas terapêuticas de concentração elevada é de interesse para a indústria farmacêutica. Os excipientes, n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e respectivas misturas, foram descobertos com o objetivo de reduzir a viscosidade de tais formulações. A invenção fornece o excipiente em concentrações selecionadas para uso na redução da viscosidade de formulações de proteínas. São fornecidos no presente documento métodos para redução da viscosidade de formulações proteicas mediante combinação da proteína terapêutica com uma concentração de um excipiente para redução da viscosidade, selecionado do grupo que consiste em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e respectivas misturas. É também fornecido um pó liofilizado compreendendo uma proteína terapêutica e um excipiente selecionado do grupo que consiste em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-

acetil-histidina, n-acetil-prolina e respectivas misturas, em que o excipiente está presente em uma concentração efetiva em peso:peso para reduzir a viscosidade mediante reconstituição com um diluente.

[0012] A menos que exigido de outro modo pelo contexto, termos no singular devem incluir pluralidades e termos no plural devem incluir o singular. Geralmente, as nomenclaturas usadas em associação com, e em técnicas de cultura celular e tecidual, biologia molecular, imunologia, microbiologia, genética e química e hibridização de proteínas e ácidos nucleicos descritas no presente documento são aquelas bem conhecidas e comumente empregadas no assunto. Os métodos e as técnicas da presente invenção são de modo geral realizados de acordo com métodos convencionais bem conhecidos no assunto e conforme descrito em várias referências gerais e mais específicas que são citadas e discutidas em toda a presente especificação a menos que de outro modo indicado. Ver, por exemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), e Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), e Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). Reações enzimáticas e técnicas de purificação são realizadas de acordo com especificações do fabricante, tal como comumente são elaboradas no assunto ou conforme descrito no presente documento. A terminologia utilizada em associação a, e nos procedimentos e técnicas laboratoriais de química analítica, química orgânica sintética e química médica e farmacêutica

descritas no presente documento é aquela bem conhecida e comumente empregada no assunto. Técnicas padrões podem ser usadas para sínteses químicas, análises químicas, preparações farmacêuticas, formulação e liberação bem como tratamento de pacientes.

[0013] Todas as patentes e outras publicações identificadas são expressamente incorporadas pelo presente documento para fins de referência em sua íntegra para os objetivos de descrição e divulgação, a exemplo das metodologias descritas em tais publicações que podem ser usadas em associação ao descrito.

[0014] Zwitterions são caracterizados como dotados de cargas positivas e negativas que resultam em uma carga final zero para o composto. Os aminoácidos, em sua maioria, são zwitterions em pH fisiológico. Conforme divulgado no presente documento, foi constatado que formulações farmacêuticas contendo zwitterions, em particular n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e respectivas misturas, geralmente possuem viscosidade mais baixa do que polióis contendo formulações simultaneamente com estabilidade maior ou comparável.

[0015] N-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina e n-acetil-prolina são versões modificadas de aminoácidos de ocorrência natural. N-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina e n-acetil-prolina incluem tanto a forma d quanto a forma l dos aminoácidos, tais como n-acetil-l-arginina, n-acetil-d-arginina, n-acetil-l-lisina, n-acetil-d-lisina, n-acetil-l-histidina, n-acetil-d-histidina, n-acetil-l-prolina e n-acetil-d-prolina.

[0016] Os termos "polipeptídeo" e "proteína" são

usados como sinônimos no presente documento. Polipeptídeos ilustrativos considerados para uso nas formulações farmacêuticas estáveis da invenção incluem anticorpos, peptícorpos, proteínas do tipo imunoglobulina, proteínas não-anticorpos e proteínas do tipo não-imunoglobulina. Análogos de proteínas de ocorrência natural são considerados para inclusão em formulações da presente invenção, compreendendo polipeptídeos com glicosilação modificada, polipeptídeos sem glicosilação (não glicosilados). Tal como se usa no presente documento, a terminologia "análogos" refere-se a uma sequência de aminoácidos que possui inserções, deleções ou substituições em relação à sequência precursora, ao mesmo tempo ainda substancialmente mantendo a atividade biológica da sequência precursora, conforme determinado usando-se ensaios biológicos conhecidos por um especialista no assunto. As formulações da invenção podem também incluir derivados de polipeptídeos de ocorrência natural ou análogos que foram quimicamente modificados, por exemplo, para ligação a polímeros solúveis em água (por exemplo, peguilados), radionuclídeos ou outros grupos funcionais diagnósticos ou marcadores ou terapêuticos.

[0017] Anticorpos podem ser formulados de acordo com a presente invenção. Tal como se usa no presente documento, o termo "anticorpo" inclui anticorpos integralmente montados, anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos humanos, humanizados ou quiméricos), anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos), maxicorpos, BiTes, DARTs e fragmentos de anticorpos que podem aglutinar antígenos (por exemplo, Fab', F' (ab)₂, Fv, anticorpos de cadeia simples, diacorpos),

compreendendo regiões determinantes de complementaridade (CDRs) dos precedentes contanto que eles exibam a atividade biológica desejada.

[0018] Peptícorpos, moléculas compreendendo um domínio Fc do anticorpo unido a pelo menos um peptídeo de ligação a antígeno, são geralmente descritos em publicação de PCT WO 00/24782. Proteínas do tipo imunoglobulina, membros da superfamília de imunoglobulinas, contêm um ou mais domínios do tipo imunoglobulina que se dobram em estruturas similares a porções da região variável do anticorpo.

[0019] Proteínas, que incluem aquelas que se ligam a uma ou mais dentre as que se seguem, poderiam ser úteis nas composições e nos métodos da presente invenção. Elas incluem proteínas CD que compreendem, mas não se limitam a, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD30 e CD34; incluindo aquelas que interferem na ligação ao receptor. Proteínas da família do receptor HER, incluindo HER2, HER3, HER4 e o receptor do EGF. Moléculas de adesão celular, a exemplo de LFA-I, MoI, p150, 95, VLA-4, ICAM-I, VCAM e integrina alfa v/beta 3. Fatores de crescimento, incluindo, mas não se limitando a fator de crescimento endotelial vascular ("VEGF"), hormônio do crescimento, hormônio estimulante da tireoide, hormônio estimulante do folículo, hormônio luteinizante, fator de liberação do hormônio do crescimento, hormônio paratireóideo, substância inibidora mulleriana, proteína inflamatória de macrófagos humanos (MIP-I-alfa), eritropoietina (EPO), fator de crescimento neural, tal como NGF-beta, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fatores de crescimento de fibroblastos, incluindo, por exemplo, aFGF e bFGF, fator de crescimento epidérmico (EGF),

fatores de crescimento transformante (TGF), incluindo, dentre outros, TGF- α e TGF- β , incluindo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 ou TGF- β 5, fatores de crescimento semelhante à insulina-I e II (IGF-I e IGF-II), des(1-3)-IGF-I (IGF-I do cérebro) e fatores osteoindutores. Insulinas e proteínas relacionadas com a insulina, incluindo, mas não se limitando a, cadeia A da insulina, cadeia B da insulina, pró-insulina e fator de crescimento semelhante à insulina de ligação a proteínas. Proteínas da coagulação e relacionadas com a coagulação, tais como, dentre outras, fator VIII, fator tecidual, fator de von Willebrand, proteína C, alfa-1-antitripsina, ativadores do plasminogênio, tais como uroquinase e ativador do plasminogênio tecidual ("t-PA"), bombazina, trombina e trombopoietina; (vii) outras proteínas sanguíneas e séricas, incluindo, mas não se limitando a, albumina, IgE e antígenos de grupo sanguíneo. Fatores estimulantes de colônia e respectivos receptores, incluindo os que se seguem, dentre outros, M-CSF, GM-CSF e G-CSF, e respectivos receptores, tais como receptor do CSF-1 (c-fms). Proteínas receptoras e associadas a receptores, incluindo, por exemplo, receptor de flk2/flt3, receptores relacionados com obesidade (OB), receptor de LDL, receptores do hormônio do crescimento, receptores de trombopoietina ("TPO-R", "c-mpl"), receptores do glucagon, receptores da interleucina, receptores do interferon, receptores de células T, receptores do fator de células-tronco, tais como c-Kit, e outros receptores relacionados no presente documento. Ligantes de receptores, incluindo, por exemplo, OX40L, o ligante para o receptor de OX40. Fatores neurotróficos, incluindo, mas não se limitando a, fator neurotrófico

derivado do cérebro (BDNF) e neurotrofina-3, -4, -5 ou -6 (NT-3, NT-4, NT-5 ou NT-6). Cadeia A da relaxina, cadeia B da relaxina e pró-relaxina; interferons e receptores do interferon, incluindo, por exemplo, interferon- α , interferon- β e interferon- γ e seus receptores. Interleucinas e receptores da interleucina, incluindo, mas não se limitando a, IL-1 a IL-33 e receptores de IL-1 a IL-33, tais como o receptor de IL-8, dentre outros. Antígenos virais, incluindo, mas não se limitando a, um antígeno viral do envoltório do vírus da AIDS. Lipoproteínas, calcitonina, glucagon, fator natriurético atrial, surfactante pulmonar, fator-alfa e -beta de necrose tumoral, encefalinase, RANTES (células T expressas e secretadas normalmente reguladas por ativação), peptídeo associado à gonadotropina do camundongo, DNase, inibina e ativina. Integrina, proteína A ou D, fatores reumatoides, imunotoxinas, proteína morfogênica óssea (BMP), superóxido-dismutase, proteínas da membrana de superfície, fator acelerador da degradação (DAF), envoltório do vírus da AIDS, proteínas de transporte, receptores de alojamento, adressinas, proteínas reguladoras, imunoadesinas, anticorpos. Miostatinas, proteínas TALL, incluindo TALL-1, proteínas amiloides, incluindo, mas não se limitando a, proteínas amiloides-beta, linfopoietinas do estroma tímico ("TSLP"), ligante de RANK ("OPGL"), c-kit, receptores do TNF, incluindo Receptor do TNF do Tipo I, TRAIL-R2, angiopoietinas e fragmentos biologicamente ativos ou análogos ou variantes de qualquer um dos precedentes.

[0020] Proteínas e anticorpos ilustrativos incluem Activase® (Alteplase); alirocumab (anticorpo monoclonal anti-PCSK9 designado como H1H316P; ver U.S.P.N. 8,062,640);

Aranesp® (Darbepoietina-alfa), Epogen® (Epoietina-alfa ou eritropoietina); Avonex® (Interferon-β-1a); Bexxar® (Tositumomab); Betaseron® (Interferon-β); bococizumab (anticorpo monoclonal anti-PCSK9 designado como L1L3; ver U.S.P.N. 8,080,243); Campath® (Alemtuzumab); Dynepo® (Epoietina-delta); Velcade® (bortezomib); MLN0002 (mAb anti-α4β7); MLN1202 (mAb anti-receptor da quimiocina CCR2); Enbrel® (etanercept); Eprex® (Epoietina-alfa); Erbitux® (Cetuximab); evolocumab (anticorpo monoclonal anti-PCSK9 designado como 21B12; ver U.S.P.N. 8,030,467); Genotropin® (Somatropina); Herceptin® (Trastuzumab); Humatrope® (somatropina [origem de rDNA] para injeção); Humira® (Adalimumab); Infergen® (Interferon-Alfacon-1); Natrecor® (nesiritida); Kineret® (Anakinra); Leukine® (Sargamostima); LymphoCide® (Epratuzumab); Benlysta™ (Belimumab); Metalyse® (Tenecteplase); Mircera® (metoxi-polietilenoglicol-epoietina-beta); MyIotarg® (Gemtuzumab-ozogamicina); Raptiva® (efalizumab); Cimzia® (certolizumab-pegol); Soliris™ (Eculizumab); Pexelizumab (Complemento Anti-C5); MEDI-524 (Numax®); Lucentis® (Ranibizumab); Edrecolomab (Panorex®); Trabio® (lerdelimumab); TheraCim hR3 (Nimotuzumab); Omnitarg (Pertuzumab, 2C4); Osidem® (IDM-I); OvaRex® (B43.13); Nuvion® (visilizumab); Cantuzumab-mertansine (huC242-DM1); NeoRecormon® (Epoietina-beta); Neumega® (Oprelvekin); Neulasta® (filgrastim pegilado, G-CSF peguilado, hu-Met-G-CSF peguilado); Neupogen® (Filgrastim); Orthoclone OKT3® (Muromonab-CD3); Procrit® (Epoietina-alfa); Remicade® (Infliximab); Reopro® (Abciximab); Actemra® (mAb anti-Receptor de IL-6); Avastin® (Bevacizumab); HuMax-CD4 (zanolimumab); Rituxan® (Rituximab); Tarceva® (Erlotinib);

Roferon-A® (Interferon-alfa-2a); Simulect® (Basiliximab);
 Stelara™ (Ustekinumab); Prexige® (lumiracoxib); Synagis®
 (Palivizumab); 146B7-CHO (anticorpo anti-IL15; ver U.S.P.N.
 7,153,507); Tysabri® (Natalizumab); Valortim® (MDX-1303, mAb
 anti-Antígeno Protetor de *B. anthracis*); ABthrax™; Vectibix®
 (Panitumumab); Xolair® (Omalizumab); ETI211 (mAb anti-MRSA);
 IL-I Trap (a porção Fc da IgG1 humana e os domínios
 extracelulares de ambos os componentes do receptor de IL-I
 [o receptor tipo I e a proteína acessória do receptor]);
 VEGF Trap (domínios de Ig de VEGFR1 fundidos com Fc da IgG1);
 Zenapax® (Daclizumab); Zevalin® (Ibritumomab-tiuxetan);
 Zetia (ezetimibe); Atacicept (TACI-Ig); mAb anti- $\alpha 4\beta 7$
 (vedolizumab); galiximab (anticorpo monoclonal anti-CD-80);
 mAb anti-CD23 (lumiliximab); BR2-Fc (huBR3/proteína de fusão
 de huFc, antagonista de BAFF solúvel); Simponi™ (Golimumab);
 Mapatumumab (mAb humano anti-Receptor de TRAIL); Ocrelizumab
 (mAb humano anti-CD20); HuMax-EGFR (zalutumumab); M200
 (Volociximab, mAb anti-integrina $\alpha 5\beta 1$); MDX-010
 (Ipilimumab); mAb anti-CTLA-4 e VEGFR-I (IMC-18F1); mAb
 anti-BR3; mAbs MDX-066 (CDA-I) e MDX-1388 anti-Toxina A e
 anti-Toxina B de *C. difficile*; conjugados dsFv-PE38 anti-
 CD22 (CAT-3888 e CAT-8015); mAb anti-CD25 (HuMax-TAC);
 anticorpos anti-TSLP (ver U.S.P.N. 7,982,016, U.S.P.N.
 8232372 e U.S. Publication Application 20090186022);
 anticorpo anti-receptor de TSLP (ver U.S.P.N. 8,101,182);
 anticorpo anti-receptor de TSLP designado como A5 (ver
 U.S.P.N. 7,982,016); (ver mAb anti-CD3 [NI-0401]);
 Adecatumumab (MT201, mAb anti-EpCAM-CD326); MDX-060, SGN-30,
 SGN-35 (mAbs anti-CD30); MDX-1333 (anti-IFNAR); HuMax CD38
 (mAb anti-CD38); mAb anti-CD40L; mAb anti-Cripto; Fibrogênio

da Fibrose Pulmonar Idiopática da Fase I anti-CTGF (FG-3019); mAb anti-CTLA4; mAb anti-eotaxin1 (CAT-213); mAb anti-FGF8; mAb anti-gangliosídeo GD2; anticorpos anti-esclerostina (ver U.S.P.N. 8,715,663 ou U.S.P.N. 7,592,429). Anticorpo anti-esclerostina designado como Ab-5 (ver U.S.P.N. 8,715,663 ou U.S.P.N. 7,592,429); mAb anti-Receptor de GM-CSF (CAM-3001); mAb anti-HepC (HuMax HepC); MEDI-545, MDX-1103 (mAb anti-IFN α); mAb anti-IGFIR; mAb anti-IGF-IR (HuMax-Inflam); mAb anti-IL12/IL23p40 (Briakinumab); mAb anti-IL-23p19 (LY2525623); mAb anti-IL13 (CAT-354); mAb anti-IL-17 (AIN457); mAb anti-IL2Ra (HuMax-TAC); mAb anti-Receptor de IL5; mAb anti-receptores da integrina (MDX-018, CNTO 95); mAb IPIO anti-Colite Ulcerativa (MDX-1100); anticorpo anti-LLY; BMS-66513; mAb anti-Receptor/hCG β de Manose (MDX-1307); conjugado dsFv-PE38 anti-mesotelina CAT-5001); mAb anti-PD1 (MDX-1 106 [ONO-4538]); anticorpo anti-PDGFR α (IMC-3G3); mAb anti-TGF β (GC-1008); mAb humano anti-Receptor-2 de TRAIL (HGS-ETR2); mAb anti-TWEAK; mAb anti-VEGFR/Flt-1; mAb anti-ZP3 (HuMax-ZP3); Anticorpo #1 NVS; Anticorpo #2 NVS; e um anticorpo monoclonal amiloide-beta compreendendo sequências, SEQ ID NO:8 e SEQ ID NO:6 (ver U.S.P.N. 7,906,625).

[0021] Concentrações de proteína ilustrativas na formulação podem variar de cerca de 70 mg/mL a cerca de 300 mg/mL, de cerca de 120 mg/mL a cerca de 270 mg/mL, de cerca de 140 mg/mL a cerca de 255 mg/mL, de cerca de 140 mg/mL a cerca de 240 mg/mL ou de cerca de 140 mg/mL a cerca de 220 mg/mL, ou alternativamente de cerca de 190 mg/mL a cerca de 210 mg/mL. A concentração de proteína dependerá do uso final da formulação farmacêutica e pode ser facilmente determinada por um especialista no assunto. Concentrações de proteína

particularmente consideradas são pelo menos cerca de 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295 e 300 mg/mL e incluindo todos os valores entre dois extremos.

[0022] Tal como se usa no presente documento, "formulação farmacêutica" é uma composição estéril de um agente terapêutico farmacêuticamente ativo, tal como uma proteína biologicamente ativa, que é apropriada para administração parenteral (incluindo, mas não se limitando a, intravenosa, intramuscular, subcutânea, na forma de aerossol, intrapulmonar, intranasal ou intratecal) a um paciente em sua necessidade e inclui somente excipientes, diluentes e outros aditivos farmacêuticamente aceitáveis considerados seguros pela Federal Drug Administration ou outras autoridades de nacionalidade estrangeira. Formulações farmacêuticas incluem soluções líquidas, por exemplo, aquosas, que podem ser administradas diretamente e pós liofilizados que podem ser reconstituídos em soluções por adição de um diluente antes de administração. Especificamente excluídas do âmbito da terminologia "formulação farmacêutica" são composições para administração tópica a pacientes, composições para ingestão oral e composições para alimentação parenteral.

[0023] "Vida útil", tal como se usa no presente documento, significa o período de armazenamento durante o qual um ingrediente ativo tal como uma proteína terapêutica em uma formulação farmacêutica sofre degradação mínima (por exemplo, degradação de não mais que cerca de 5% a 10%) quando

a formulação farmacêutica é armazenada em condições de armazenamento especificadas, por exemplo, 2-8°C. Técnicas para avaliação de degradação variam dependendo da identidade da proteína na formulação farmacêutica. Técnicas ilustrativas incluem cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)-HPLC para detectar, por exemplo, agregação, (RP)-HPLC de fase reversa para detectar, por exemplo, fragmentação de proteína, HPLC por troca iônica para detectar, por exemplo, alterações na carga da proteína, espectrometria de massa, espectroscopia fluorescente, espectroscopia de dicroísmo circular (CD), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e espectroscopia de Raman para detectar alterações de conformação em proteínas. Todas essas técnicas podem ser usadas isoladamente ou em combinação para avaliar a degradação da proteína na formulação farmacêutica e determinar a vida útil da formulação farmacêutica. As formulações farmacêuticas da presente invenção preferivelmente exibem aumentos de não mais que 5% a 10% na degradação (por exemplo, fragmentação, agregação ou desdobramento) no decorrer de dois anos quando armazenadas a 2-8°C.

[0024] Tal como se usa no presente documento, formulações "estáveis" de proteínas biologicamente ativas são formulações que exibem agregação reduzida e/ou perda reduzida de atividade biológica de pelo menos 20% quando armazenadas a 2-8°C durante pelo menos dois anos em comparação com uma amostra de fórmula controle, ou alternativamente que exibem agregação reduzida e/ou perda reduzida de atividade biológica em condições de pressão térmica, por exemplo, 25°C durante 1 semana a 12 semanas;

40°C durante 1 a 12 semanas, 52°C durante 7-8 dias etc.

[0025] Tal como se usa no presente documento, "viscosidade" consiste em resistência de um fluido a fluir e pode ser determinada em unidades de centipoise (cP) ou miliPascal-segundo (mPa-s), em que $1 \text{ cP} = 1 \text{ mPa-s}$, a uma determinada taxa de cisalhamento. A viscosidade pode ser determinada usando-se um viscosímetro, por exemplo, Brookfield Engineering Dial Reading Viscometer, modelo LVT, e instrumentos AR-G2, TA. A viscosidade pode ser determinada usando-se quaisquer outros métodos e em quaisquer outras unidades conhecidas no assunto (por exemplo, viscosidade absoluta, cinemática ou dinâmica), compreendendo-se que é a redução percentual na viscosidade proporcionada pelo uso dos excipientes descritos pela invenção que é importante. Seja qual for o método usado para determinar a viscosidade, a redução percentual na viscosidade em formulações do excipiente *versus* formulações controles permanecerão a mesma a uma determinada taxa de cisalhamento.

[0026] Tal como se usa no presente documento, uma formulação contendo uma quantidade de um excipiente efetiva para "reduzir a viscosidade" (ou uma quantidade ou uma concentração de tal excipiente "reduzora de viscosidade") significa que a viscosidade da formulação em sua forma final para administração (se uma solução, ou se um pó mediante reconstituição com a quantidade pretendida de diluente) é pelo menos 5% menor do que a viscosidade de uma formulação controle apropriada, tal como água, tampão ou outros agentes redutores de viscosidade tais como sal etc., e daquelas formulações controles tais como aquelas exemplificadas no presente documento. Formulações controles isentas de

excipiente podem também ser usadas mesmo que elas não possam ser aplicáveis como uma formulação terapêutica em razão de hipotonicidade, por exemplo.

[0027] Similarmente, uma formulação com “viscosidade reduzida” é uma formulação que exhibe viscosidade reduzida em comparação com uma formulação controle.

[0028] Agentes terapêuticos à base de proteína frequentemente precisam ser administrados em concentrações elevadas que podem resultar em viscosidade aumentada da solução. É altamente desejável fornecer formulações com concentração elevada que não exibam a viscosidade aumentada comumente observada nessas concentrações elevadas de proteína.

[0029] Formulações com alta viscosidade são difíceis de manipular durante fabricação, incluindo os estágios de ampliação de volume e preenchimento. Formulações com alta viscosidade são também difíceis de aspirar em uma seringa e injetar, frequentemente exigindo o uso de agulhas de menor calibre que podem ser desagradáveis para o paciente. A adição de n-acetil-l-arginina a soluções de proteína biologicamente ativa reduziu a viscosidade de soluções contendo proteína em concentração elevada.

[0030] O uso de um excipiente selecionado do grupo que consiste em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e respectivas misturas permite que uma concentração mais elevada de proteínas terapêuticas seja usada na formulação sem um aumento muito grande na viscosidade conforme é comumente observado com outros excipientes. Assim, a invenção fornece um método para estabilização ou redução da viscosidade de formulações à

base de proteínas por adição de um excipiente selecionado do grupo que consiste em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e respectivas misturas em uma quantidade efetiva para reduzir a viscosidade. A invenção também fornece formulações de proteínas terapêuticas com viscosidade reduzida, incluindo anticorpos, contendo quantidades ou concentrações efetivas de um excipiente selecionado do grupo que consiste em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e respectivas misturas. São também propostos métodos de análise de uma ou mais formulações, cada uma delas contendo diferentes concentrações do excipiente descrito no presente documento para identificar concentrações adequadas e ótimas que reduzam a viscosidade. São ainda fornecidos métodos de preparação de um pó liofilizado a partir de formulações de solução com viscosidade reduzida da invenção e métodos de reconstituição dos pós liofilizados da invenção mediante adição de um diluente estéril.

[0031] Desse modo, a presente invenção fornece formulações farmacêuticas contendo polipeptídeos biologicamente ativos e concentrações redutoras da viscosidade de um excipiente selecionado do grupo que consiste em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e respectivas misturas. A redução na viscosidade é de pelo menos cerca de 5-90% *versus* formulações controles. Em uma modalidade, a redução na viscosidade varia de cerca de 10-80%. Em outras modalidades ilustrativas, a redução na viscosidade é de pelo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% ou 85%.

[0032] As formulações da invenção podem opcionalmente incluir sais, tampões, surfactantes, outros excipientes, transportadores, diluentes e/ou outros agentes de formulação farmacêuticamente aceitáveis.

[0033] Tampões farmacêuticamente aceitáveis ilustrativos incluem acetato (por exemplo, acetato de sódio), succinato (tal como succinato de sódio), ácido glutâmico, glutamato, gluconato, histidina, citrato ou outros tampões de ácido orgânico. Concentração do tampão ilustrativa pode ser de cerca de 1 mM a cerca de 200 mM ou de cerca de 10 mM a cerca de 60 mM, dependendo, por exemplo, do tampão e da tonicidade desejada (por exemplo, isotônica, hipertônica ou hipotônica) da formulação. Exemplos de pHs incluem cerca de 4,5 a cerca de 8,0, ou cerca de 4,8 a cerca de 5,5, ou cerca de 4 a 6, ou cerca de 5 a 5,5, ou cerca de 5, maior que cerca de 5, maior que cerca de 5,5, maior que cerca de 6 ou maior que cerca de 6,5.

[0034] Diluentes, outros excipientes ou transportadores e outros agentes apropriados incluem, mas não se limitam a, antioxidantes, agentes de coloração, aromatizantes e diluentes, agentes emulsificantes, agentes de suspensão, solventes, agentes de preenchimento, agentes de volume, tampões, veículos, diluentes e/ou adjuvantes farmacêuticos. Por exemplo, um veículo apropriado pode ser solução salina fisiológica, salina tamponada com citrato ou CSF artificial, possivelmente suplementados com outros materiais comuns em composições para administração parenteral. Salina tamponada neutra ou salina misturada com albumina sérica constitui outro exemplo de veículos. Especialistas no assunto irão facilmente reconhecer uma

variedade de tampões que poderiam ser usados nas composições e formas de apresentação utilizadas na invenção. Tampões típicos incluem, mas não se limitam a, ácidos fracos, bases fracas ou respectivas misturas farmacologicamente aceitáveis. Componentes do tampão ilustrativos são materiais solúveis em água, tais como ácido fosfórico, ácidos tartáricos, ácido láctico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido acético, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido glutâmico ou respectivos sais. Exemplos de sais incluem ácidos inorgânicos e orgânicos ou bases tais como metais ou aminas, em concentrações ilustrativas tais como cerca de 50-200 mM, ou 100-200 mM, ou cerca de 100 mM ou cerca de 150 mM.

[0035] Outros excipientes ou estabilizadores podem também incluir, por exemplo, açúcares (por exemplo, sacarose, glicose, trealose, frutose, xilose, manitose, fucose), polióis (por exemplo, glicerol, manitol, sorbitol, glicol, inositol), aminoácidos ou derivados de aminoácidos (por exemplo, arginina, prolina, histidina, lisina, glicina, metionina etc.) ou surfactantes (por exemplo, polissorbato, incluindo polissorbato 20 ou polissorbato 80), ou poloxâmeros, incluindo poloxâmero 188, TPGS (succinato de d-alfatocoferil-poli-etilenoglicol 1000). Concentrações ilustrativas de surfactante podem variar de cerca de 0,001% a cerca de 1,0% ou de cerca de 0,003% a cerca de 0,5%. Podem também ser incluídos conservantes, tais como álcool benzílico, fenol, m-cresol, clorobutanol ou cloreto de benzetonio, por exemplo, em concentrações que variam de cerca de 0,1% a cerca de 2% ou de cerca de 0,5% a cerca de 1%.

[0036] Um ou mais outros transportadores, excipientes ou estabilizadores farmacologicamente aceitáveis

tais como aqueles descritos em Remington's Pharmaceutical Sciences 21st edition, Osol, A. Ed. (2005), podem ser incluídos na formulação desde que não interfiram adversamente nas características desejadas da formulação.

[0037] A concentração da proteína terapêutica, tal como um anticorpo, na formulação dependerá do uso final da formulação farmacêutica e pode ser facilmente determinada por um especialista no assunto.

[0038] Proteínas terapêuticas que são antagonistas são frequentemente administradas em concentrações mais elevadas do que aquelas que são agonistas. Concentrações elevadas de proteínas terapêuticas particularmente propostas (sem que se considere o peso de modificações químicas tais como peguilação), incluindo anticorpos, são de pelo menos cerca de 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 250, 300, 350, 400, 450, ou 500 mg/mL e/ou inferiores a cerca de 250, 300, 350, 400, 450 ou 500 mg/mL. Exemplos de concentrações elevadas de proteínas terapêuticas, tais como anticorpos, na formulação podem variar de pelo menos cerca de 100 mg/mL a cerca de 500 mg/mL. Outras concentrações de proteínas (sem que se considere o peso de modificações químicas tais como peguilação) são também propostas, por exemplo, pelo menos cerca de 1, 5, 10, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ou 70 mg/mL. A invenção particularmente propõe formulações e métodos em que a concentração de proteínas terapêuticas resulta em uma viscosidade de pelo menos 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35 cP ou mais elevada, tal como 100, 125, 150, 175 ou 200 cP, e a inclusão de um excipiente selecionado do grupo que consiste em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-

acetil-histidina, n-acetil-prolina e respectivas misturas resulta na redução da viscosidade em 5% ou mais. Por exemplo, uma solução com uma viscosidade de cerca de 30 cP pode ser difícil de se injetar com uma agulha de calibre 27 padrão. Todas as referências a concentração de proteína terapêutica em mg/mL, peso da proteína terapêutica (mg) ou peso molecular da proteína terapêutica (kD) no presente documento significam o peso respectivo da parte proteinácea da proteína terapêutica, excluindo-se quaisquer modificações não-proteináceas.

[0039] A presente invenção fornece um método de redução da viscosidade e/ou melhora na estabilidade de uma formulação farmacêutica líquida de uma proteína terapêutica, por combinação da proteína terapêutica com uma quantidade redutora de viscosidade de um excipiente selecionado do grupo que consiste em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e respectivas misturas.

[0040] Em modalidades ilustrativas, a proteína terapêutica está em uma concentração elevada de proteína conforme descrito anteriormente. Em algumas modalidades, a redução na viscosidade é de pelo menos, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% ou 85% em comparação com formulações controles.

[0041] Em outro aspecto, a invenção fornece soluções líquidas compreendendo uma proteína terapêutica e um excipiente selecionado do grupo que consiste em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e respectivas misturas em que as formulações exibem viscosidade reduzida em relação a formulações controles. Em modalidades ilustrativas, a proteína terapêutica está em uma

concentração elevada de proteína conforme descrito anteriormente. Em algumas modalidades, o excipiente descrito no presente documento está presente em uma concentração redutora de viscosidade (em peso:volume). Qualquer um desses excipientes pode ser usado em concentrações acima do seu limite de solubilidade. Essas soluções podem ainda compreender um açúcar ou outro poliol tal como sacarose ou sorbitol ou um aminoácido tal como arginina, prolina, histidina, lisina, glicina, metionina etc. em uma quantidade efetiva para proporcionar melhora adicional na estabilidade, reduzir agregação e/ou tornar a formulação isotônica, sem aumento significativo na viscosidade.

[0042] Em modalidades ilustrativas, a concentração do excipiente selecionado do grupo que consiste em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e respectivas misturas é de pelo menos cerca de 50 mM a cerca de 300 mM, ou de pelo menos cerca de 100 mM a cerca de 250 mM, ou de pelo menos cerca de 140 mM a cerca de 200 mM. Em modalidades ilustrativas, a concentração do excipiente é de pelo menos cerca de 50, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 200, 210, 220, 250 ou 300 mM ou mais. Outras modalidades ilustrativas incluem concentrações do excipiente efetivas para tornar a formulação isotônica, sem aumento significativo na viscosidade. Concentrações ilustrativas incluem aquelas de pelo menos cerca 180 mM ou mais; em outras modalidades, as quantidades são de pelo menos 200 mM ou mais.

[0043] Em outro aspecto, a invenção fornece formulações de proteínas liofilizadas compreendendo uma proteína terapêutica e um excipiente selecionado do grupo

que consiste em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e respectivas misturas em que, mediante reconstituição com a quantidade recomendada de diluente, as formulações exibem viscosidade reduzida em relação a formulações controles. Em modalidades ilustrativas, a proteína terapêutica está em uma concentração elevada de proteína conforme descrito anteriormente. Em algumas modalidades, o excipiente está presente em uma quantidade efetiva para reduzir a viscosidade mediante reconstituição com um diluente (concentração em peso:peso). Essas formulações podem ainda compreender um açúcar ou outro poliol tal como sacarose ou sorbitol ou pelo menos um aminoácido tal como arginina, prolina, histidina, lisina, glicina, metionina etc. em uma quantidade efetiva para promover melhora adicional na estabilidade, reduzir agregação e/ou tornar a formulação isotônica, sem aumento significativo na viscosidade.

[0044] Em modalidades ilustrativas, a concentração do excipiente selecionado do grupo que consiste em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e respectivas misturas é de pelo menos 1 µg por mg de proteína terapêutica, até cerca de 1,0 mg por mg de proteína terapêutica. Em algumas modalidades, a concentração do excipiente é de pelo menos cerca de 1, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 ou 550 µg por mg de proteína terapêutica. Em outras modalidades ilustrativas, a concentração do excipiente é de até cerca de 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 ou 1.000 µg por mg de proteína terapêutica.

[0045] Já em outra modalidade, a presente invenção

fornece um método destinado a impedir autoassociação de proteínas em formulações líquidas pelo uso de n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e respectivas misturas como um excipiente em qualquer uma das quantidades ou concentrações descritas no presente documento. Formulações com estabilidade melhorada (por exemplo, agregação reduzida) e vida útil são também fornecidas.

[0046] A invenção também fornece um *kit* compreendendo uma formulação de proteína líquida da invenção e instruções para sua administração, opcionalmente com um recipiente, uma seringa e/ou outro dispositivo de administração. A invenção ainda fornece um *kit* compreendendo uma formulação de proteína liofilizada da invenção, opcionalmente com um recipiente e instruções para sua reconstituição e administração, opcionalmente com um frasco de diluente estéril e opcionalmente com uma seringa ou outro dispositivo de administração. Exemplos de recipientes incluem frascos, tubos, ampolas, seringas pré-preenchidas únicas ou de múltiplas câmaras ou cartuchos. Exemplos de dispositivos de administração incluem seringas, com ou sem agulhas, bombas de infusão, injetores de jato, equipamentos do tipo caneta, injetores transdérmicos ou outro injetor isento de agulha ou um dispositivo de administração por aerossol para administração nasal ou pulmonar.

[0047] Em outro aspecto, é fornecido um método para análise de uma concentração redutora de viscosidade de um excipiente compreendendo as etapas de: (1) avaliação da viscosidade de uma primeira solução compreendendo uma primeira concentração de um excipiente selecionado do grupo

que consiste em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e respectivas misturas e uma proteína terapêutica, tal como um anticorpo, (2) avaliação da viscosidade de uma segunda solução compreendendo uma segunda concentração diferente do excipiente e a proteína terapêutica e (3) determinação de que a primeira concentração de excipiente é mais redutora de viscosidade do que a segunda concentração de excipiente se a primeira solução for menos viscosa. A viscosidade pode ser determinada, por exemplo, usando-se um Aries ARG2 Rheometer ou um Brookfield RV-DVIII Rheometer.

[0048] São fornecidos métodos similares para análise de uma concentração de um excipiente redutora de agregação ou estabilizante.

[0049] A estabilidade pode ser avaliada de muitas maneiras, incluindo monitoramento de alteração na conformação através de uma faixa de temperaturas (termoestabilidade) e/ou períodos de tempo (vida útil) e/ou após exposição a situações de manipulação exaustiva (por exemplo, agitação física). A estabilidade de formulações contendo concentrações variadas de componentes da formulação pode ser determinada usando-se diversos métodos. Por exemplo, a quantidade de agregação de proteína pode ser determinada mediante observação visual de turvação, por mensuração de absorbância em um comprimento de onda específico, mediante cromatografia por exclusão de tamanho (em que agregados de proteína irão separar-se em diferentes frações em comparação com a proteína em seu estado ativo natural), por meio de HPLC ou por outros métodos cromatográficos. Podem ser usados outros métodos para

avaliação de alteração na conformação, incluindo uso de calorimetria por varredura diferencial (DSC), por exemplo, para determinar a temperatura de desnaturação, ou dicroísmo circular (CD), que define a elipticidade molar da proteína. Fluorescência pode também ser usada para analisar a composição. A fluorescência inclui a liberação ou a absorção de energia na forma de luz ou calor e alterações nas propriedades polares da luz. A emissão de fluorescência pode ser intrínseca a uma proteína ou pode ser decorrente de uma molécula repórter de fluorescência. Por exemplo, ANS é uma sonda fluorescente que se fixa a bolsas hidrofóbicas de proteínas parcialmente desdobradas. À medida que a concentração de proteína desdobrada aumenta, o número de bolsas hidrofóbicas aumenta e subsequentemente a concentração de ANS que pode ligar-se aumenta. Esse aumento na ligação de ANS pode ser monitorado por detecção do sinal de fluorescência de uma amostra de proteína. Outros meios de mensuração da estabilidade podem ser usados e são bem conhecidos por especialistas no assunto.

[0050] A invenção pode ser mais completamente compreendida por referência aos exemplos a seguir que detalham modalidades ilustrativas da invenção. Entretanto, eles não devem ser interpretados como limitantes do campo de ação da invenção. Todas as citações no decorrer de toda a divulgação são por meio deste documento expressamente incorporadas para fins de referência.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

[0051] Uma preparação de anticorpo IgG2 (140 mg/mL) (Anticorpo A) foi dialisada contra 10 mM de Glutamato de

Sódio e Sacarose a 1% com pH de 5,2 usando-se tubos de diálise plissados MWCO 10.000 Snakeskin® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). 120 mg/mL de Anticorpo A em 10 mM de Glutamato de Sódio e Sacarose a 1% com pH de 5,2 foram distribuídos em frascos de 3 cc na proporção de 1 mL em cada. Os frascos foram liofilizados usando-se um liofilizador Virtis. Os frascos foram reconstituídos com 450 µL de várias soluções (água-controle ou 200 mM de soluções de excipiente). Após reconstituição, as concentrações de Anticorpo A foram determinadas, usando-se instrumento SOLO-VPE, como 190 mg/mL. A viscosidade foi mensurada usando-se reômetro Aries ARG2 a 25°C e está registrada na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Formulações de excipiente do Anticorpo A, 190 mg/mL a 20°C

Identificação do Tampão	Excipiente
A	200 mM de Prolina
B	200 mM de Glutamato de Arginina
C	200 mM de n-Acetil-L-Arginina
D	200 mM de Propionato de Guanidina
E	200 mM de Taurociamina
F	200 mM de n-Acetil-L-Prolina

G	200 mM de n-Acetil-L-Glicina
H	200 mM de n-Acetil-L-Lisina
I	Água-controle

[0052] A Figura 1 mostra os efeitos dos vários excipientes sobre a viscosidade da solução de anticorpo. Os dados mostram que os excipientes testados reduziram a viscosidade em relação à água-controle.

EXEMPLO 2

[0053] Uma preparação de anticorpo IgG1 (70 mg/mL) (Anticorpo B) e uma preparação de anticorpo IgG2 (70 mg/mL) (Anticorpo C) foram dialisadas contra 20 mM de Acetato de Sódio com pH de 4,7 e 4,9 respectivamente usando-se tubos de diálise MWCO 10.000. Amostras de anticorpo foram concentradas usando-se filtros de centrifugação MWCO 30.000 e uma Allegra X-12R Centrífuga. Concentrações da amostra de anticorpo foram determinadas usando-se um espectrofotômetro Agilent UV/Vis. Amostras contendo excipiente foram preparadas por inoculação de uma solução concentrada de abastecimento com excipientes sólidos pré-pesados. Amostras viscosas foram transferidas usando-se pipetas de deslocamento positivo. As viscosidades foram determinadas usando-se um reômetro programável Brookfield RV-DV III+ a 25°C e estão registradas nas Tabelas 2.1 e 2.2 abaixo.

Tabela 2.1: Anticorpo B – 210 mg/mL

Formulação	Viscosidade (cP), 225/s, 25°C
Controle sem Excipiente	26,0

200 mM de n-Acetil-L-Arginina	14,3
-------------------------------	------

Tabela 2.2: Anticorpo C – 140 mg/mL

Formulação	Viscosidade (cP), 225/s, 25°C
Controle sem Excipiente	22,7
200 mM de n-Acetil-L-Arginina	10,0

[0054] Para o excipiente, n-acetil-l-arginina, a redução na viscosidade do Anticorpo B é de aproximadamente 45% e a redução na viscosidade do Anticorpo C é de aproximadamente 56%.

EXEMPLO 3

[0055] Uma preparação de anticorpo IgG2 (140 mg/mL) (Anticorpo D) foi dialisada contra 10 mM de Glutamato de Sódio e Sacarose a 1% com pH de 5,2 usando-se tubos de diálise plissados MWCO 10.000 Snakeskin® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). 100 mg/mL de Anticorpo D em 10 mM de Glutamato de Sódio e Sacarose a 1% com pH de 5,2 foram distribuídos em frascos de 3 cc na proporção de 1 mL em cada. Os frascos foram liofilizados usando-se um liofilizador Virtis. Os frascos foram reconstituídos com 450 µL de água (controle – sem excipiente) ou com 10 mM de Glutamato e 200 mM de n-Acetil-L-Arginina com pH de 5,2. As concentrações do Anticorpo D foram determinadas usando-se instrumento SOLO-VPE. A viscosidade foi mensurada usando-se reômetro Aries ARG2 a 25°C e está registrada na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3: Anticorpo D – 175 mg/mL

Formulação	Viscosidade (cP), 1000/s, 25°C
Controle sem Excipiente	38,7
200 mM de n-Acetil-L-	23,4

Arginina	
----------	--

[0056] Para o excipiente, n-acetil-l-arginina, a redução na viscosidade do Anticorpo D é de aproximadamente 40%.

EXEMPLO 4

[0057] Uma preparação de anticorpo IgG2 (140 mg/mL) (Anticorpo E) foi concentrada usando-se ultrafiltração e diafiltração para 200 mg/mL com 6 volumes de diafiltração de Tampão A (10 mM de Glutamato e 260 mM de n-acetil-l-arginina com pH de 4,6) ou Tampão B (10 mM de Glutamato de Sódio com pH de 4,6). O pH final das amostras UFDF foi determinado como 5,2. Concentrações do Anticorpo E foram determinadas usando-se instrumento SOLO-VPE. A viscosidade foi mensurada usando-se reômetro Aries ARG2 a 20°C e está registrada na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4: Anticorpo E – 200 mg/mL

Formulação	Viscosidade (cP), 1000/s, 20°C
Anticorpo E em Tampão B (Controle)	62,1
Anticorpo E em Tampão A (260 mM de n-Acetil-L-Arginina)	28,6

[0058] Para o excipiente, n-acetil-l-arginina, a redução na viscosidade do Anticorpo E é de aproximadamente 54%.

EXEMPLO 5

[0059] Uma preparação de anticorpo IgG2 (140 mg/mL) (Anticorpo A) foi dialisada contra 10 mM de Glutamato de Sódio e Sacarose a 1% com pH de 5,2 usando-se tubos de diálise plissados MWCO 10.000 Snakeskin® (Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA). 120 mg/mL de Anticorpo A em 10 mM de Glutamato de Sódio e Sacarose a 1% com pH de 5,2 foram distribuídos em frascos de 3 cc na proporção de 1 mL em cada. Os frascos foram liofilizados usando-se um liofilizador Virtis. Os frascos foram reconstituídos com 450 µL de várias soluções (água-controle ou 200 mM de soluções de excipiente) (ver Tabela 5 abaixo). Após reconstituição, as concentrações de Anticorpo A foram determinadas, usando-se instrumento SOLO-VPE, como 190 mg/mL. A viscosidade foi mensurada usando-se reômetro Aries ARG2 a 25°C e está registrada na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5: Formulações de excipiente do Anticorpo A, 190 mg/mL a 20°C

Identificação do Tampão	Excipiente
A	200 mM de Histidina
B	200 mM de n-Acetil-L-Histidina
C	200 mM de n-Acetil-L-Arginina
D	Controle

[0060] A Figura 2 mostra os efeitos dos vários excipientes sobre a viscosidade da solução de anticorpo. Os dados mostram que os excipientes testados reduziram a viscosidade em relação ao controle, e os excipientes, n-acetil-l-arginina e n-acetil-l-histidina, reduziram a viscosidade em relação ao excipiente histidina isoladamente.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para redução da viscosidade de uma formulação farmacêutica líquida compreendendo um anticorpo em uma concentração de 70 mg/mL a 500 mg/mL, **caracterizado** por compreender a combinação do anticorpo com 5 mM a 700 mM de um excipiente selecionado do grupo que consiste em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e suas respectivas misturas, em que a concentração do anticorpo após a referida combinação é de 70 mg/ml a 500 mg/mL, e em que a viscosidade da formulação farmacêutica líquida é reduzida em comparação a uma formulação controle.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o excipiente é n-acetil-arginina.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o excipiente é n-acetil-lisina.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o excipiente é n-acetil-histidina.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o excipiente é n-acetil-prolina.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a viscosidade da formulação é reduzida em 25% ou mais.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a viscosidade da formulação é reduzida em 50% ou mais.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a viscosidade da formulação é reduzida em 80% ou mais.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado** pelo fato de que a concentração do excipiente é de 50 mM a 300 mM, ou 100 mM a 400 mM.

10. Composição farmacêutica, obtida pelo método conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizada** por compreender um anticorpo em concentração de 70 mg/mL a 500 mg/mL, e 5 mM a 700 mM de um excipiente selecionado do grupo consistindo em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e suas respectivas misturas, em que a viscosidade é reduzida em comparação a uma formulação controle.

11. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada** pelo fato de que o excipiente é n-acetil-arginina.

12. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada** pelo fato de que o excipiente é n-acetil-lisina.

13. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada** pelo fato de que o excipiente é n-acetil-histidina.

14. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada** pelo fato de que o excipiente é n-acetil-prolina.

15. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada** pelo fato de que a concentração do excipiente é 100 mM a 400 mM, ou 200 mM a

300 mM.

16. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada** pelo fato de que a concentração do excipiente é 140 mM a 170 mM.

17. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 16, **caracterizada** por ter uma viscosidade de 6 cP a 30 cP.

18. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 17, **caracterizada** por possuir um pH entre 4,0 a 8,0.

19. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizada** por possuir um pH entre 4,6 a 5,4.

20. Método de preparação de um pó liofilizado **caracterizado** por compreender a etapa de liofilizar uma composição farmacêutica, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 10 a 19.

21. Pó liofilizado, obtido pelo método conforme definido na reivindicação 20, **caracterizado** por compreender um anticorpo e 5 mM a 700 mM de um excipiente selecionado do grupo que consiste em n-acetil-arginina, n-acetil-lisina, n-acetil-histidina, n-acetil-prolina e suas respectivas misturas.

22. Pó liofilizado, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado** pelo fato de que o excipiente está presente em uma concentração que varia entre 100 µg/mg do anticorpo a 1 mg/mg do anticorpo.

23. Pó liofilizado, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado** pelo fato de que o excipiente está presente em uma concentração que varia entre 200 µg a 500 µg/mg do

anticorpo a 1 mg/mg do anticorpo.

24. Pó liofilizado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 23, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo monoclonal humano, humanizado ou quimérico.

25. Método para reconstituição de um pó liofilizado, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 21 a 24, **caracterizado** por compreender a etapa de adição de um diluente aquoso estéril.

26. Formulação farmacêutica ou composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 19, ou pó liofilizado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 24, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo monoclonal humano, humanizado ou quimérico.

Figura 1

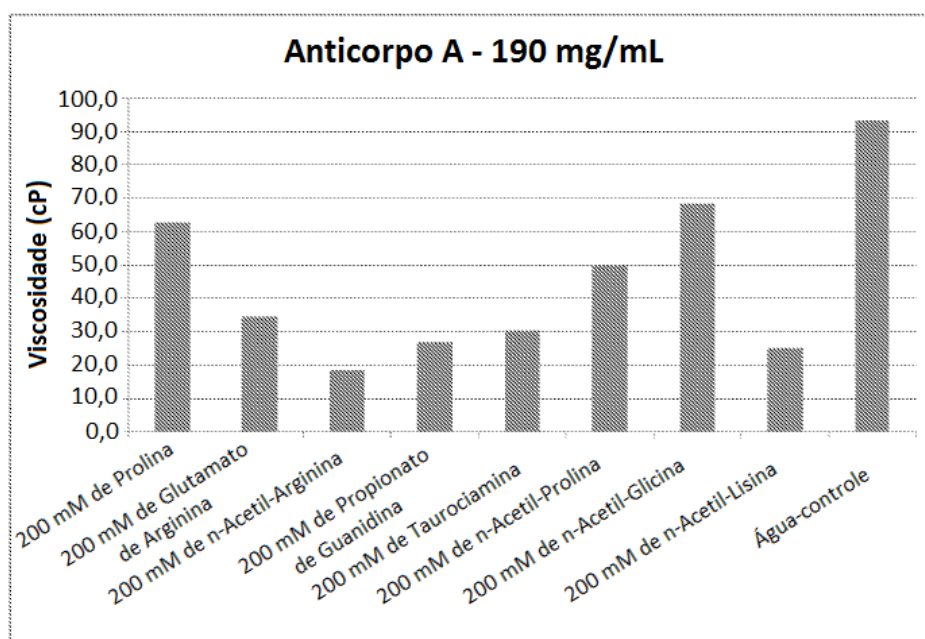


Figura 2

