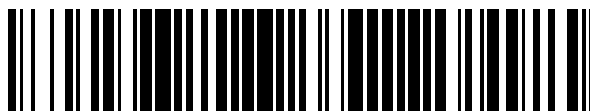


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 407**

51 Int. Cl.:
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06719621 .2**
96 Fecha de presentación: **27.01.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1853310**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.11.2007**

54 Título: **Formulación de anticuerpos anti-a-beta**

30 Prioridad:
28.01.2005 US 648631 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.11.2012

73 Titular/es:
JANSSEN ALZHEIMER IMMUNOTHERAPY
(50.0%)
2nd Floor, Treasury Building Lower Grand Canal
Street
Dublin 2, IE y
WYETH LLC (50.0%)

72 Inventor/es:
LUISI, DONNA;
WARNE, NICHOLAS, W. y
KANTOR, ANGELA

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 391 407 T3

DESCRIPCIÓN

Formulación de anticuerpos anti-A-beta

Antecedentes de la invención

5 La enfermedad de Alzheimer ("EA") es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por la aparición de placas de amiloide, marañas neurofibrilares y una significativa pérdida de neuronas. La proteína β -amiloide (también denominado el péptido A β), el principal componente de las placas seniles, se ha implicado en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer (Selkoe (1989) Cell 58: 611-612; Hardy (1997) Trends Neurosci. 20:154-159). Se ha demostrado que la proteína β -amiloide es directamente tóxica para las neuronas en cultivo (Lorenzo y Yankner (1996) Ann. NY Acad. Sci. 777:89-95) e indirectamente tóxica a través de varios mediadores (Koh y col. (1990) Brain Research 533:315-320; Mattson y col. (1992) J. Neurosciences 12:376-389). Adicionalmente, los modelos in vivo, incluido el ratón PDAPP y un modelo de rata han vinculado la proteína β -amiloide con déficits en aprendizaje, alteración de la función cognitiva e inhibición de la potenciación en el hipocampo a largo plazo (Chen y col. (2000) Nature 408:975-985; Walsh y col. (2002) Nature 416:535-539). Por tanto, gran parte del interés se ha centrado en terapias que alteran los niveles de β -amiloide para reducir potencialmente la gravedad, o incluso anular, la propia enfermedad.

Una estrategia de tratamiento para la EA recientemente aparecida en respuesta a estudios con éxito en modelos experimentales con ratones y ratas PDAPP es que la inmunización de individuos para proporcionar inmunoglobulinas, tales como anticuerpos (como en el caso de la inmunización pasiva, en la que las inmunoglobulinas terapéuticas se administran a un sujeto) o para generar inmunoglobulinas (inmunización activa, en la que el sistema inmunológico de un sujeto se activa para producir inmunoglobulinas frente a un antígeno administrado) específicas de la proteína β -amiloide. A su vez, estos anticuerpos reducirían la carga de las placas previniendo la agregación de β -amiloide (Solomon y col. (1997) Neurobiology 94:4109-4112) o estimulando las células de microglía hacia fagocitos y eliminar las placas (Bard y col. (2000) Nature Medicine 6: 916-919). Además, a modo de ejemplo, un anticuerpo monoclonal IgG1 anti-péptido A β humanizado (un anticuerpo 3D6 humanizado) puede tratar con eficacia la EA mediante unión selectiva del péptido A β humano.

Para que una proteína y, en concreto, un anticuerpo, permanezca biológicamente activo, una formulación debe preservar intacta la integridad conformacional de al menos una secuencia central de los aminoácidos de la proteína al tiempo que protege de la degradación a múltiples grupos funcionales de la proteína. Las vías de degradación para proteínas pueden implicar inestabilidad química (es decir, cualquier procedimiento que implica la modificación de la proteína mediante formación de enlaces o escisión que tiene como resultado una nueva entidad química) o inestabilidad física (es decir, cambios en la estructura de mayor orden de la proteína). La inestabilidad química puede ser el resultado de desamidación, racemización, hidrólisis, oxidación, beta, eliminación o intercambio de disulfuro. La inestabilidad física puede ser el resultado de, por ejemplo, desnaturalización, agregación, precipitación o adsorción. Para una revisión general de la estabilidad de las sustancias farmacéuticas proteicas véase, por ejemplo, Manning, y col. (1989) Pharmaceutical Research 6:903-918. Además, es deseable mantener la estabilidad cuando los polipéptidos vehículo no están incluidos en la formulación.

Aunque la posible aparición de inestabilidades proteicas es ampliamente apreciado, es imposible predecir problemas concretos de inestabilidad para una proteína concreta. Cualquiera de estas inestabilidades puede tener como resultado, potencialmente, la formación de un subproducto o derivado que tiene una actividad menor, mayor toxicidad y/o mayor inmunogenicidad. De hecho, la precipitación de polipéptido puede conducir a trombosis, ausencia de homogeneidad de la forma farmacéutica y reacciones inmunitarias. Por tanto, la seguridad y la eficacia de cualquier formulación farmacéutica de un polipéptido están directamente relacionadas con su estabilidad.

De acuerdo con esto, sigue existiendo la necesidad de formulaciones que no solo mantengan la estabilidad y la actividad biológica de polipéptidos biológicos, por ejemplo de polipéptidos que se unen a A β , tras almacenamiento y liberación, pero también son adecuados para varias vías de administración terapéutica.

El alcance de la presente invención viene definida por las reivindicaciones y cualquier información que no entre dentro de las reivindicaciones se proporciona únicamente a efectos informativos.

Sumario de la invención

50 La presente divulgación proporciona formulaciones diseñadas para proporcionar estabilidad y para mantener la actividad biológica de una proteína incorporada biológicamente activa, en concreto proteínas o polipéptidos de unión a A β , tales como, por ejemplo, anticuerpos frente a A β , o fragmentos o porciones de los mismos. La divulgación además proporciona formulaciones polipeptídicas, tales como, por ejemplo, formulaciones polipeptídicas líquidas estabilizadas que son resistentes a la formación de subproductos polipeptídicos no deseados.

55 La integridad de los polipéptidos de unión a antígeno para uso terapéutico es especialmente importante porque si el polipéptido forma subproductos, por ejemplo agregados o fragmentos de degradación durante el almacenamiento, se puede perder bioactividad, de modo que pone en peligro la actividad terapéutica de la molécula por unidad de dosis. Además, existe un deseo agudo de estabilizar los polipéptidos terapéuticos destinados a funciones

especializadas para liberación y uso de ciertas indicaciones biológicas, por ejemplo tratamiento de afecciones neurodegenerativas, en las que un polipéptido debe atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y unirse a un antígeno diana.

5 En un aspecto, la presente divulgación proporciona una formulación estabilizada que incluye al menos un polipéptido de unión a A β , están presentes al menos un agente de tonicidad en una cantidad suficiente para hacer que la formulación sea adecuada para administración y al menos un agente tampón en una cantidad suficiente para mantener un pH fisiológicamente adecuado. La formulación puede ser una formulación liofilizada o líquida. Algunas formulaciones incluyen al menos un antioxidante tal como, por ejemplo, un antioxidante de aminoácido, tal como, por ejemplo, metionina. En algunas formulaciones, el agente de tonicidad es manitol o NaCl. En algunas formulaciones, al menos un agente tampón es succinato, fosfato sódico o un aminoácido tal como histidina. Formulaciones preferidas también incluyen al menos un estabilizante, tal como, por ejemplo, polisorbato 80. En algunas formulaciones, el estabilizante es polisorbato 80, el antioxidante es metionina, el agente de tonicidad es manitol, sorbitol o NaCl y el agente tampón es histidina. En algunas formulaciones se selecciona al menos un polipéptido de unión a A β del grupo constituido por un anticuerpo anti-A β , un fragmento Fv del anticuerpo anti-A β , un fragmento Fab del anticuerpo anti-A β , un fragmento Fab'(2) del anticuerpo anti-A β , un fragmento Fd del anticuerpo anti-A β , un anticuerpo anti-A β monocatenario (scFv), un fragmento del anticuerpo anti-A β de dominio único (dav), un polipéptido en lámina beta que incluye al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo de un anticuerpo anti-A β y un polipéptido no globular que incluye al menos una CDR del anticuerpo de un anticuerpo anti-A β . En algunas formulaciones, al menos un polipéptido de unión a A β es un anticuerpo anti-A β , por ejemplo, que se une específicamente al epítipo en los restos 1-7, 1-5, 3-7, 3-6, 13-28, 15-24, 16-24, 16-21, 19-22, 33-40, 33-42 de A β o un fragmento Fab, Fab'(2) o Fv del mismo. Ejemplos de anticuerpos anti-A β se unen específicamente a un epítipo en los restos 1-10 de A β , tal como, por ejemplo, en los restos 1-7, 1-5, 3-7 o 3-6 de A β . Otros ejemplos de anticuerpos anti-A β se unen específicamente a un epítipo en los restos 13-28 de A β , tal como, por ejemplo, en los restos 16-21 o 19-22 de A β . Otros ejemplos más de anticuerpos anti-A β se unen específicamente a un epítipo en C terminal de A β , tal como, por ejemplo, 33-40 o 33-42 de A β . Los anticuerpos anti A β preferidos incluyen un anticuerpo anti A β humanizado, por ejemplo un anticuerpo 3D6 humanizado, un anticuerpo 10D5 humanizado, un anticuerpo 12B4 humanizado, un anticuerpo 266 humanizado, un anticuerpo 12A11 humanizado o un anticuerpo 15C11 humanizado.

30 En algunas formulaciones, el anticuerpo anti A β se une a un epítipo discontinuo que incluye restos en 1-7 y en 13-28 de A β . En algunas de estas formulaciones, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo fabricado mediante el procedimiento descrito en la publicación de patente internacional n^o WO03/070760. En algunas de estas formulaciones, el epítipo es un epítipo discontinuo. En formulaciones preferidas, el anticuerpo A β es un anticuerpo 3D6 humanizado, un anticuerpo 10D5 humanizado, un anticuerpo 12B4 humanizado, un anticuerpo 266 humanizado, un anticuerpo 12A11 humanizado o un anticuerpo 15C11 humanizado.

35 El isotipo del anticuerpo puede ser IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o cualquier otro isotipo farmacéuticamente aceptable. En formulaciones preferidas, el isotipo es IgG1 humana o IgG4 humana. En algunas formulaciones líquidas, la concentración del anticuerpo anti-A β es de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 60 mg/ml, de aproximadamente 40 mg/ml a aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, de aproximadamente 17 mg/ml a aproximadamente 23 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 17 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml o aproximadamente 1 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 17 mg/ml a aproximadamente 23 mg/ml.

45 En algunas formulaciones, al menos un agente de tonicidad es D-manitol y está presente a una concentración de aproximadamente 1 % en p/v a aproximadamente 10 % en p/v, de aproximadamente 2% en p/v a aproximadamente 6 % en p/v, o preferentemente aproximadamente 4% en p/v. En algunas formulaciones, al menos un agente tampón es histidina y está presente a una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 25 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, preferentemente aproximadamente 5 mM o aproximadamente 10 mM. En otras formulaciones, al menos un agente tampón es succinato y está presente a una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 25 mM, tal como, por ejemplo, a aproximadamente 10 mM. En algunas formulaciones, el antioxidante es metionina y está presente a una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 25 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, o preferentemente aproximadamente 10 mM. En formulaciones preferidas, el estabilizante es polisorbato 80 y está presente a una concentración de aproximadamente 0,001 % en p/v a aproximadamente 0,01% en p/v, de aproximadamente 0,005% en p/v a aproximadamente 0,01% en p/v, o aproximadamente 0,005% en p/v. La formulación puede tener un pH de aproximadamente 5 a 7, de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,0, o aproximadamente 5,5, preferentemente aproximadamente 6,0.

60 Una formulación preferida tiene un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,5 e incluye un anticuerpo anti-A β que se une específicamente a un epítipo en los restos seleccionados del grupo constituido por 1-7, 1-5,3-7, 3-6,13-28,15-24,16-24,16-21,19-22, 33-40 y 33-42 de A β , por ejemplo, D-manitol a una concentración de aproximadamente 2 % en p/v a aproximadamente 6%, por ejemplo histidina a una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 25 mM, metionina a una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 25 mM, y un estabilizante. Preferentemente, el estabilizante es polisorbato 80 a una

concentración de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,01 % en p/v.

La formulación puede ser una formulación de polipéptido líquido estabilizada diseñada para proporcionar estabilidad y para mantener la actividad biológica del polipéptido incorporado. La formulación incluye un polipéptido de unión a A β terapéuticamente activo y un antioxidante en una cantidad suficiente para reducir la formación del subproducto del polipéptido durante el almacenamiento de la formulación.

Algunas de las formulaciones polipeptídicas líquidas se estabilizan contra la formación de subproductos no deseados tales como agregados polipeptídicos de alto peso molecular, productos de degradación polipeptídica de bajo peso molecular o mezclas de los mismos.

En las formulaciones en las que el polipéptido de unión al antígeno terapéutico es un anticuerpo, los típicos agregados de alto peso molecular que se van a minimizar son, por ejemplo, anticuerpos: Complejos de anticuerpo, complejos de anticuerpo:fragmento de anticuerpo, complejos de fragmento de anticuerpo:fragmento de anticuerpo o mezclas de los mismos. En general, los complejos o subproductos de alto peso molecular tienen un peso molecular superior a un monómero del polipéptido de unión al antígeno, por ejemplo, en el caso de un anticuerpo IgG, superior a aproximadamente 150 kD. En dichas formulaciones de anticuerpo, los típicos productos de degradación polipeptídica de bajo peso molecular que se van a minimizar son, por ejemplo, complejos constituidos por una cadena ligera de anticuerpo, una cadena pesada de anticuerpo, un complejo de cadena ligera de anticuerpo y una cadena pesada de anticuerpo, o mezclas de los mismos. En general, los complejos o subproductos de bajo peso molecular tienen un peso molecular inferior al de un monómero del polipéptido de unión al antígeno, por ejemplo, en el caso de un anticuerpo IgG, inferior a aproximadamente 150 kD.

Una formulación estabilizada preferida de un anticuerpo anti-A β incluye metionina como antioxidante en una cantidad suficiente para inhibir la formación de subproductos indeseados, un agente de tonicidad, por ejemplo, en una cantidad suficiente para hacer que la formulación sea adecuada para administrar, y, por ejemplo, un aminoácido o derivado del mismo en una cantidad suficiente para mantener un pH fisiológicamente adecuado.

Algunas formulaciones son estables cuando están congeladas. La formulación puede ser adecuada para administrar por vía parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracraneal o epidural, preferentemente intravenosa o subcutánea. Algunas formulaciones pueden ser adecuadas para liberación dirigida al cerebro o al líquido cefalorraquídeo de un sujeto. La formulación puede carecer sustancialmente de conservantes. Algunas formulaciones son estables durante al menos aproximadamente 12 meses, al menos aproximadamente 18 meses, al menos aproximadamente 24 meses o al menos aproximadamente 30 meses. Algunas formulaciones son estables a aproximadamente -80 °C a aproximadamente 40°C, a aproximadamente 0°C a aproximadamente 25°C, a aproximadamente 0°C a aproximadamente 10°C, preferentemente a aproximadamente - 80°C a aproximadamente - 50°C o en aproximadamente 2°C a aproximadamente 8°C .

Algunas formulaciones son estables durante aproximadamente 12 meses a una temperatura superior a la de congelación a aproximadamente 10 °C y tiene un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. Dicha formulación incluye al menos un anticuerpo A β a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml, manitol a una concentración de aproximadamente 4 % en p/v o NaCl a una concentración de aproximadamente 150 mM, histidina o succinato a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM, y metionina 10 mM. Una de estas formulaciones tiene un pH de aproximadamente 6,0, aproximadamente 1 mg/ml del anticuerpo A β , histidina aproximadamente 10 mM y aproximadamente 4 % en p/v de manitol. Otras formulaciones son estables durante al menos aproximadamente 24 meses a una temperatura de aproximadamente 2 °C e incluyen polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0,001 % en p/v a aproximadamente 0,01 % en p/v. Algunas de estas formulaciones tienen un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,5 e incluyen histidina aproximadamente 10 mM, aproximadamente 4 % en p/v de manitol y aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml o aproximadamente 5 mg/ml del anticuerpo A β . Otras de estas formulaciones incluyen histidina aproximadamente 10 mM, aproximadamente 4 % en p/v de manitol, aproximadamente 0,005 % en p/v de polisorbato 80 y aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml del anticuerpo A β , preferentemente a un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,2.

El anticuerpo A β en dichas formulaciones es, preferentemente, un anticuerpo 3D6 humanizado, un anticuerpo 10D5 humanizado, un anticuerpo 12B4 humanizado, un anticuerpo 266humanizado, un anticuerpo 12A11 humanizado o un anticuerpo 15C11 humanizado. Una de estas formulaciones tiene un pH de aproximadamente 6,0 a 6,5 e incluye histidina aproximadamente 10 mM, aproximadamente 4 % en p/v de manitol y de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml de un anticuerpo A β seleccionado del grupo constituido por un anticuerpo 3D6 humanizado, un anticuerpo 10D5 humanizado, un anticuerpo 12B4 humanizado y un anticuerpo 12A11 humanizado. Otra de estas formulaciones tiene un pH de aproximadamente 6,0 a 6,5 e incluye histidina aproximadamente 10 mM, NaCl aproximadamente 150 mM y de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml de un anticuerpo A β seleccionado del grupo constituido por un anticuerpo 12B4 humanizado y un anticuerpo 12A11 humanizado. Otra más de estas formulaciones tiene un pH de aproximadamente 6,0 a 6,5 e incluye histidina aproximadamente 10 mM, aproximadamente 4 % de manitol en p/v y de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml de un anticuerpo A β seleccionado del grupo constituido por un anticuerpo 266 humanizado y un anticuerpo 15C11 humanizado.

- Una formulación preferida es estable durante al menos aproximadamente 24 meses a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C, tiene un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5 e incluye de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 23 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 17 mg/ml a aproximadamente 23 mg/ml de un anticuerpo 3D6 humanizado, histidina aproximadamente 10 mM y metionina aproximadamente 10 mM. Preferentemente, la formulación incluye además aproximadamente 4 % en p/v de manitol. La formulación incluye preferentemente polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0,001 % en p/v a aproximadamente 0,01 % en p/v, más preferentemente aproximadamente 0,005% en p/v de polisorbato 80. En dichas formulaciones, el anticuerpo 3D6 humanizado puede estar presente a una concentración de aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 23 mg/ml.
- 5
- Otra formulación es estable durante al menos aproximadamente 24 meses a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C, tiene un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5 e incluye de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 23 mg/ml de un anticuerpo 3D6 humanizado, succinato aproximadamente 10mM, metionina aproximadamente 10 mM, aproximadamente 4 % en p/v de manitol y aproximadamente 0,005% en p/v de polisorbato 80. En algunas de estas formulaciones, el anticuerpo 3D6 humanizado está presente a una concentración de aproximadamente 17 mg/ml a aproximadamente 23 mg/ml.
- 10
- 15
- Otra formulación preferida es estable durante al menos aproximadamente 24 meses a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C, tiene un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,5 e incluye de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml de un anticuerpo 266 humanizado, histidina aproximadamente 10 mM y metionina aproximadamente 10 mM. Algunas de estas formulaciones incluyen además aproximadamente 4 % en p/v de manitol. Algunas de estas formulaciones incluyen polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0,001% en p/v a aproximadamente 0,01% en p/v, por ejemplo en aproximadamente 0,005% en p/v de polisorbato 80. En algunas de estas formulaciones, el anticuerpo 266 humanizado está presente a una concentración de aproximadamente 17 mg/ml o aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 23 mg/ml.
- 20
- Otra formulación más es estable durante al menos aproximadamente 24 meses a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C, tiene un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,5 e incluye de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml de un anticuerpo 266 humanizado, succinato aproximadamente 10 mM, metionina aproximadamente 10 mM, aproximadamente 4 % en p/v de manitol y aproximadamente 0,005 % en p/v de polisorbato.
- 25
- Otra formulación preferida es estable durante al menos aproximadamente 24 meses a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C, tiene un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,5 e incluye de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml de un anticuerpo 12A11 humanizado, histidina aproximadamente 10 mM y metionina aproximadamente 10 mM. Algunas de estas formulaciones incluyen NaCl aproximadamente 150 mM. Dichas formulaciones pueden incluir polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0,001% en p/v a aproximadamente 0,01% en p/v, tal como, por ejemplo en aproximadamente 0,005% en p/v de polisorbato 80. En algunas de estas formulaciones, el anticuerpo 12A11 humanizado está presente a una concentración de aproximadamente 17 mg/ml o aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 23 mg/ml.
- 30
- 35
- Otra formulación más es estable durante al menos aproximadamente 24 meses a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C, tiene un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,5 e incluye de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml de un anticuerpo 12A11 humanizado, histidina aproximadamente 10 mM, metionina aproximadamente 5 mM, aproximadamente 4 % en p/v de manitol y aproximadamente 0,005 % en p/v de polisorbato 80.
- 40
- La divulgación también proporciona una formulación que es estable cuando se descongela de aproximadamente -50 °C a aproximadamente 80 °C, tiene un pH de aproximadamente 6,0 e incluye aproximadamente 40 a aproximadamente 60 mg/ml de un anticuerpo anti A β , de aproximadamente 1,0 mg/ml a aproximadamente 2,0 mg/ml de histidina, de aproximadamente 1,0 mg/ml a aproximadamente 2,0 mg/ml de metionina y aproximadamente 0,05 mg/ml de polisorbato 80. Preferentemente se excluye el manitol. Preferentemente, el anticuerpo A β es un anticuerpo 3D6 humanizado o un anticuerpo 266 humanizado.
- 45
- La presente divulgación también proporciona una formulación líquida que incluye un anticuerpo A β , manitol e histidina. En algunas de estas formulaciones, el anticuerpo A β está presente de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml. Preferentemente, el manitol está presente en una cantidad suficiente para mantener la isotonicidad de la formulación. Preferentemente, la histidina está presente en una cantidad suficiente para mantener un pH fisiológicamente adecuado. Una de estas formulaciones incluye aproximadamente 20 mg/ml del anticuerpo anti A β , L-histidina aproximadamente 10 mM, metionina aproximadamente 10 mM, aproximadamente 4 % de manitol y tiene un pH de aproximadamente 6. Otra de estas formulaciones incluye aproximadamente 30 mg/ml del anticuerpo anti A β , succinato aproximadamente 10 mM, metionina aproximadamente 10 mM, aproximadamente 6 % de manitol y tiene un pH de aproximadamente 6,2. Otra más de estas formulaciones incluye aproximadamente 20 mg/ml del anticuerpo anti A β , histidina aproximadamente 10 mM, metionina aproximadamente 10 mM, aproximadamente 4 % de manitol, aproximadamente 0,005 % de polisorbato 80 y tiene un pH de aproximadamente
- 50
- 55
- 60

6. Otra de estas formulaciones incluye aproximadamente 10 mg/ml del anticuerpo A β , succinato aproximadamente 10 mM, metionina aproximadamente 10 mM, aproximadamente 10% de manitol, aproximadamente 0,005 % de polisorbato 80 y tiene un pH de aproximadamente 6,5.

5 Otra formulación más incluye de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml del anticuerpo anti A β , L-histidina de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM, metionina aproximadamente 10 mM, aproximadamente 4 % de manitol, aproximadamente 0,005 % de polisorbato 80, y tiene un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,5. Otra más de estas formulaciones incluye de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml del anticuerpo anti A β , L-histidina de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM, metionina aproximadamente 10 mM, aproximadamente 0,005 % de polisorbato 80, y tiene un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,5.

La presente divulgación también proporciona una formulación adecuada para administración intravenosa que incluye Otra aproximadamente 20 mg/ml de un anticuerpo A β , L-histidina aproximadamente 10 mM, metionina aproximadamente 10 mM, aproximadamente 4% de manitol y tiene un pH de aproximadamente 6. Preferentemente, esta formulación incluye aproximadamente 0,005 % de polisorbato 80.

15 La divulgación proporciona un procedimiento para incrementar la estabilidad de un polipéptido de unión a antígeno, por ejemplo un anticuerpo, en una formulación farmacéutica líquida, en la que el polipéptido exhibiría, de otro modo, formación de subproductos durante el almacenamiento en una formulación líquida. De acuerdo con esto, el procedimiento comprende incorporar en la formulación un antioxidante, por ejemplo metionina o un análogo de la misma, en una cantidad suficiente para reducir la cantidad de formación de subproducto.

20 La presente divulgación también proporciona un procedimiento para mantener la estabilidad de una formulación de anticuerpo anti A β humanizado que se va a almacenar a una temperatura de aproximadamente -50 °C a aproximadamente -80 °C, seguido de almacenamiento a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C, que comprende (i) combinar de aproximadamente 40 mg/ml a aproximadamente 60 mg/ml del anticuerpo anti A β humanizado, de aproximadamente a 1 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml de L-histidina, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml de metionina y aproximadamente 0,05 mg/ml de polisorbato 80; (ii) ajustar el pH a aproximadamente 6,0; (iii) filtrar en un criovaso y congelar; (iv) descongelar; (v) añadir manitol o NaCl, de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml de anticuerpo anti A β humanizado; histidina aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM; metionina aproximadamente 10 mM y aproximadamente 0,005 % de polisorbato 80; (vi) filtrar; (vii) transferir a un vial de vidrio y sellar y (viii) almacenar a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C.

La presente divulgación también proporciona un kit que incluye un contenedor con una formulación descrita en el presente documento e instrucciones de uso.

35 La presente divulgación también proporciona una forma farmacéutica unitaria, que incluye una formulación de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 250 mg de un anticuerpo A β , aproximadamente 4% de manitol o aproximadamente NaCl 150 mM, histidina o succinato de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM y metionina aproximadamente 10 mM. Algunas de las formas unitarias farmacéuticas incluyen aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,1 % de polisorbato 80. Algunas de estas formas unitarias farmacéuticas incluyen de aproximadamente 40 mg a aproximadamente 60 mg, de aproximadamente 60 mg a aproximadamente 80 mg, de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 120 mg, de aproximadamente 120 mg a aproximadamente 160 mg, o de aproximadamente 160 mg a aproximadamente 240 mg del anticuerpo A β . Algunas de estas formulaciones se pueden mantener en un vial de vidrio a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C antes de la administración a un paciente.

45 Además, la presente divulgación proporciona un producto terapéutico que incluye un vial de vidrio con una formulación que incluye de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 250 mg de un anticuerpo A β humanizado, aproximadamente 4 % de manitol o aproximadamente NaCl 150 mM, histidina de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM y metionina aproximadamente 10 mM. Algunos de estos productos terapéuticos incluyen además un marcaje para usar que incluye instrucciones de uso del volumen adecuado necesario para alcanzar una dosis de aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg en un paciente. Normalmente, el vial es un vial de 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml o 50 ml. La dosis de algunos de estos productos terapéuticos es de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg. En algunos de estos productos terapéuticos, la concentración del anticuerpo anti anti-A β es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 60 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 20 mg/ml. Preferentemente, el producto terapéutico incluye de aproximadamente 0,005 % de polisorbato 80. La formulación de algunos de estos productos terapéuticos es para administración subcutánea o administración intravenosa.

55 La presente divulgación también proporciona un procedimiento para tratar profiláctica o terapéuticamente una enfermedad que se caracteriza por depósitos de A β que incluye administrar por vía intravenosa o subcutánea una dosis unitaria farmacéutica como se ha descrito en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

La *Figura 1* representa una representación esquemática de la estructura predicha de un anticuerpo IgG y las posiciones aproximadas de enlaces disulfuro intra e intercatenarios, sitios de glicosilación (símbolo hexagonal), regiones determinantes de la complementariedad (CDR), regiones estructurales (sombreadas) y regiones constantes.

La *Figura 2* muestra las secuencias de aminoácidos completas de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo anti-A β 3D6 humanizado versión 2 (hu3D6,v2), SEC ID N $^{\circ}$ 1 y SEC ID N $^{\circ}$ 2, respectivamente. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en la cadena ligera, es decir CDR1, CDR2, y CDR3, están, respectivamente, en las posiciones de los restos 24-39, 55-61, y 94-102 (panel superior). Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en la cadena pesada, es decir CDR1, CDR2, y CDR3, están, respectivamente, en las posiciones de los restos 40-44, 50-65, y 99-108 (panel inferior). Los puentes disulfuro intramoleculares predichos se ilustran mediante conexiones de los restos de cisteína implicados. Las cisteínas que se espera que formen puentes disulfuro intramoleculares están subrayadas y la conectividad indicada. El sitio consenso de glicosilación unidos por N de la cadena pesada del anticuerpo está indicada en cursiva en las posiciones de los restos 299-301 (panel inferior). La lisina en C-terminal de la cadena pesada predicha se muestra entre paréntesis.

La *Figura 3* representa gráficamente las predicciones de la vida de almacenamiento para las formulaciones de anticuerpos (con y sin polisorbato 80 PS80) preparadas de acuerdo con la presente invención y almacenadas a 5 $^{\circ}$ C.

La *Figura 4* representa gráficamente las predicciones de la vida de almacenamiento para las formulaciones de anticuerpos (con y sin PS80) preparadas de acuerdo con la presente invención y almacenadas a 25 $^{\circ}$ C.

La *Figura 5* representa gráficamente las predicciones de la vida de almacenamiento para las formulaciones de anticuerpos (con y sin PS80) preparadas de acuerdo con la presente invención y almacenadas a 40 $^{\circ}$ C.

La *Figura 6* representa gráficamente las predicciones de degradación de las formulaciones con PS80 preparadas de acuerdo con la presente invención y almacenadas a 5 $^{\circ}$ C.

La *Figura 7* representa gráficamente el análisis mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de las formulaciones con PS80 preparadas de acuerdo con la presente invención, almacenadas a 5 $^{\circ}$ C y reprocesadas para minimizar la variabilidad del ensayo.

La *Figura 8* representa gráficamente las predicciones de degradación de las formulaciones sin PS80 preparadas de acuerdo con la presente invención y almacenadas a 5 $^{\circ}$ C.

La *Figura 9* representa un cromatograma que indica que la presencia de PS80 desplaza los subproductos encontrados dentro de la formulación polipeptídica estabilizada de una especie de alto peso molecular a una especie de bajo peso molecular sin cambiar el perfil del anticuerpo monomérico.

La *Figura 10* representa gráficamente la inhibición de la formación de subproductos no deseados en una formulación polipeptídica que comprende IgG4, en particular agregados polipeptídicos de alto peso molecular, tras la adición de un antioxidante tal como metionina libre.

La *Figura 11* representa gráficamente la inhibición de la formación de subproductos no deseados en una formulación polipeptídica que comprende IgG2, en particular agregados polipeptídicos de alto peso molecular, tras la adición de un antioxidante tal como metionina libre.

Descripción detallada de la invención

Con el fin de proporcionar una comprensión clara de la memoria descriptiva y reivindicaciones, a continuación se proporcionan de un modo conveniente las siguientes definiciones.

Como se usa en el presente documento, la expresión “enfermedad amiloidogénica” incluye cualquier enfermedad asociada (o causada) con la formación o depósito de fibrillas de amiloide insolubles. Ejemplos de enfermedades amiloidogénicas incluyen, entre otros, amiloidosis sistémica, enfermedad de Alzheimer, diabetes de inicio en la madurez, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, demencia fronto-temporal, y encefalopatías espongiiformes transmisibles relacionadas con priones (kuru y enfermedad de Creutzfeldt-Jacob en seres humanos y tembladera y BSE en ganado ovino y bovino, respectivamente). Las diferentes enfermedades amiloidogénicas se definen o caracterizan por la naturaleza del componente polipeptídico de las fibrillas depositadas. Por ejemplo, en sujetos o pacientes que tienen enfermedad de Alzheimer, la proteína β -amiloide (por ejemplo, de tipo silvestre, variante o proteína β -amiloide truncada) es el componente polipeptídico de caracterización del depósito amiloide. Por consiguiente, la enfermedad de Alzheimer es un ejemplo de una “enfermedad caracterizada por depósitos de A β ” o una “enfermedad asociada con depósitos de A β ”, por ejemplo, en el cerebro de un sujeto o paciente.

Los términos “proteína β -amiloide”, “péptido β -amiloide”, “ β -amiloide”, “A β ” y “péptido A β ” se usan indistintamente en el presente documento.

La expresión “polipéptido de unión a A β ” incluye polipéptidos capaces de unirse específicamente a péptido(s) A β o a epítipo(s) dentro de dichos péptidos A β . Normalmente, los polipéptidos de unión a A β comprenden al menos una porción funcional de una inmunoglobulina o dominio de tipo inmunoglobulina, por ejemplo un receptor que comprende una o más regiones de variabilidad o regiones determinantes de complementariedad (CDR) que imparten una característica de unión específica al polipéptido. Polipéptidos de unión a antígeno preferidos incluyen anticuerpos, por ejemplo, IgM, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4.

El término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina y a porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina (moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno), incluidos anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos quiméricos, anticuerpos con injertos de CDR y anticuerpos monocatenarios (scFv). La expresión "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen solo una especie de un sitio de unión a antígeno capaz de reconocer y unirse a un epítipo concreto de un antígeno diana, por ejemplo un(os) epítipo(s) de Aβ. Por tanto, una composición de anticuerpo monoclonal normalmente muestra una especificidad y afinidad de unión sencilla por un antígeno diana concreto con el que inmunorreacciona. La expresión "anticuerpo de cadena sencilla" se refiere a una proteína que tiene una estructura de cadena de dos polipéptidos constituida por una cadena pesada y una cadena ligera, estando dichas cadenas estabilizadas mediante, por ejemplo, engarces peptídicos intercatenarios, que tiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno. Las técnicas para producir anticuerpos de cadena sencilla específicos del antígeno diana se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4,946,778. La expresión "fragmento de anticuerpo" incluye fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos Fd, fragmentos Fv y fragmentos de anticuerpo de dominio único (DAb). Porciones inmunológicamente activas de inmunoglobulinas incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂. Procedimientos para la construcción de fragmentos Fab se describen en, por ejemplo, Huse, y col. (1989) Science 246:1275-1281. Se pueden producir otros fragmentos de anticuerpo mediante técnicas conocidas en la material, incluidos, entre otros: (i) un fragmento F(ab')₂ producido mediante digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (ii) un fragmento Fab generado mediante la reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂; (iii) un fragmento Fab' generado tratando la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor, y (iv) fragmentos Fv. También se pueden producir varios fragmentos mediante técnicas de ingeniería recombinante reconocidas en la técnica. Los anticuerpos no humanos pueden ser "humanizados" mediante técnicas descritas en, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5,225,539. En un procedimiento, las CDR no humanas se insertan en una secuencia estructural de un anticuerpo humano o un anticuerpo consenso. Después, se pueden introducir otros cambios en la estructura del anticuerpo para modular la afinidad o la inmunogenicidad.

El término "dominio" se refiere a una región globular de un polipéptido de cadena pesada o ligera que comprende un pliegue de inmunoglobulina. El pliegue de inmunoglobulina está compuesto por la estructura secundaria plegada en lámina β e incluye un puente disulfuro sencillo. Los dominios denominan adicionalmente en el presente documento "constantes" o "variables", basándose en la ausencia relativa de variación de secuencia dentro de los dominios de diversos miembros de la clase en el caso de un dominio "constante", o la variación significativa dentro de los dominios de diversos miembros de la clase en el caso de un dominio "variable". Los "dominios" de anticuerpo o polipéptido a menudo se denominan de forma indistinta en la técnica "regiones" de anticuerpo o polipéptido. Los dominios "constantes" en una cadena ligera se denominan indistintamente "regiones constantes de cadena ligera", "dominios constantes de cadena ligera", regiones "CL" o dominios "CL". Los dominios "constantes" en una cadena pesada se denominan indistintamente "regiones constantes de cadena pesada", "dominios constantes de cadena pesada", regiones "CH" o dominios "CH". Los dominios "variables" en una cadena ligera de anticuerpo se denominan indistintamente "regiones variables de cadena ligera", "dominios variables de cadena ligera", regiones "VL" o dominios "VL". Los dominios "variables" en una cadena pesada de un anticuerpo se denominan indistintamente "regiones variables de cadena pesada", "dominios variables de cadena pesada", regiones "VH" o dominios "VH".

El término "región" también se puede referir a una parte o porción de una cadena de anticuerpo o dominio de cadena de anticuerpo (por ejemplo, una parte o porción de una cadena pesada o ligera o una parte o porción de un dominio constante o variable, como se define en el presente documento), así como partes o porciones más discretas de dichas cadenas o dominios. Por ejemplo, las cadenas ligera y pesada o los dominios variables de cadena ligera y pesada incluyen "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR" intercaladas entre "regiones estructurales conservadas" o "FR", como se define en el presente documento.

El término "anticuerpo anti-Aβ" incluye anticuerpos (y fragmentos de los mismos) que son capaces de unirse a epítipo(s) del péptido Aβ. Los anticuerpos anti-Aβ incluyen, por ejemplo, los anticuerpos descritos en la publicación de patente de EE.UU. n° 20030165496A1, la publicación de patente de EE.UU. n° 20040087777A1, la publicación de patente internacional n° WO02/46237A3 y la publicación de patente internacional n° WO04/080419A2. Otros anticuerpos anti-Aβ se describen en, por ejemplo, las publicaciones de patente internacional n° WO03/077858A2 y WO04/108895A2, ambas tituladas "Anticuerpos humanizados que reconocen el péptido beta amiloide", la publicación de patente internacional n° WO03/016466A2 titulada "Anticuerpos Anti-Aβ", la publicación de patente internacional n° WO0162801A2, titulada "Anticuerpos humanizados que secuestran el péptido beta amiloide", y la publicación de patente internacional n° WO02/088306A2, titulada "Anticuerpos humanizados" y la publicación de patente internacional n° WO03/070760A2, titulada "anticuerpos anti-Aβ y su uso."

El término "fragmento" se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende menos restos de aminoácidos que un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos se pueden obtener mediante tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos también se pueden obtener por medios recombinantes. Ejemplos de fragmentos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y/o Fv. La expresión "fragmento de unión a antígeno" se refiere a un fragmento

polipeptídico de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une a un antígeno o compete con un anticuerpo intacto (del que procede por la unión específica al antígeno).

El término “conformación” se refiere a la estructura terciaria de una proteína o polipéptido, tal como, por ejemplo, un anticuerpo, cadena de anticuerpo, dominio o región del mismo. Por ejemplo, la frase “conformación de cadena ligera (o pesada)” se refiere a la estructura terciaria de una región variable de cadena ligera (o pesada) y la frase “conformación de anticuerpo” o “conformación de fragmento de anticuerpo” se refiere a la estructura terciaria de un anticuerpo o fragmento del mismo.

El término “unión específica” de un anticuerpo significa que el anticuerpo exhibe una afinidad apreciable por un antígeno o un epítipo concreto y, preferentemente, no presenta reactividad cruzada significativa. El anticuerpo puede no presentar reactividad cruzada (por ejemplo, no sufre reacción cruzada con los péptidos que no son A β o con epítopos remotos o distantes en A β). Una unión “apreciable” o preferida incluye la unión con una afinidad de al menos 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M o 10^{-10} M. Son más preferidas las afinidades mayores de 10^{-7} , preferentemente mayores de 10^{-8} M. También se pretende que estén dentro del ámbito de la presente invención valores intermedios de los expuestos en el presente documento y puede indicarse una afinidad de unión preferida como un intervalo de afinidades, por ejemplo, de 10^{-6} a 10^{-10} M, preferentemente de 10^{-7} a 10^{-10} M, más preferentemente de 10^{-8} a 10^{-10} M. Un anticuerpo que “no presenta una reactividad cruzada significativa” es uno que no se unirá apreciablemente a una entidad no deseable (por ejemplo, una proteína, polipéptido o péptido no deseado). Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a A β se unirá apreciablemente a A β pero no reaccionará de forma significativa con proteínas o péptidos que no son A β (por ejemplo, proteínas o péptidos que no son A β incluidos en placas). Un anticuerpo específico de un epítipo concreto, por ejemplo, no presentará reacción cruzada de forma significativa con epítopos remotos o diferentes en la misma proteína o péptido. La unión específica puede determinarse de acuerdo con cualquier medio reconocido en la técnica para determinar dicha unión. Preferentemente, la unión específica se determina de acuerdo con el análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva.

Los fragmentos de unión se producen mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv, cadenas individuales y anticuerpos monocatenarios. Se entiende que un anticuerpo o inmunoglobulina distinto a un anticuerpo o inmunoglobulina “biespecífico” o “bifuncional” tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. Un anticuerpo “biespecífico” o “bifuncional” es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante diversos procedimientos, incluidos fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songvilai & Lachmann Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny y col., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

Un “antígeno” es una molécula (por ejemplo, una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato o molécula pequeña) que contiene un determinante antigénico al que se une específicamente un anticuerpo.

El término “epítipo” o “determinante antigénico” se refiere a un sitio sobre un antígeno al que se une específicamente una inmunoglobulina o anticuerpo (o un fragmento de unión a antígeno del mismo). Los epítopos se pueden formar a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente están retenidos a la exposición de disolventes desnaturizantes, mientras que los epítopos formados por el plegamiento terciario normalmente se pierden con el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo normalmente incluye al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Procedimientos para determinar la conformación espacial de los epítopos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

La expresión “formulación estabilizada” o “formulación de polipéptido líquida estabilizada” incluye formulaciones en las que el polipéptido en ellas retiene esencialmente su identidad e integridad física y química con el almacenamiento. En la técnica se dispone de varias técnicas analíticas para medir la estabilidad proteica y se describen en el presente documento (revisadas en, Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993)). La estabilidad se puede medir a una temperatura determinada durante un periodo de tiempo seleccionado. Para un análisis rápido, la formulación se puede mantener a una temperatura “acelerada” o mayor, por ejemplo a 40 °C durante de 2 semanas a 1 mes o más, tiempo tras el cual se mide la estabilidad. La formulación puede ser resistente a la formación de subproductos del componente polipeptídico, por ejemplo agregados polipeptídicos de alto peso molecular, productos de degradación o fragmentación de bajo peso molecular o mezclas de los mismos. El término “estabilidad” se refiere a la longitud de tiempo sobre el cual una especie molecular, como un anticuerpo, retiene su identidad química, por ejemplo su estructura primaria, secundaria y/o terciaria.

El término “subproducto” incluye productos no deseados que reducen o disminuyen la proporción de polipéptido terapéutico en una formulación dada. Los subproductos típicos incluyen agregados del polipéptido terapéutico, fragmentos del polipéptido terapéutico (por ejemplo, producidos mediante degradación del polipéptido mediante desamidación o hidrólisis) o mezclas de los mismos.

La expresión “agregados polipeptídicos de alto peso molecular” incluye agregados de fragmentos del polipéptido terapéutico (por ejemplo, producidos mediante degradación del polipéptido mediante, por ejemplo, hidrólisis) o mezclas de los mismos. Normalmente, los agregados de alto peso molecular son complejos que tienen un peso molecular superior al del polipéptido monomérico terapéutico. En el caso de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo IgG, dichos agregados son mayores que aproximadamente 150 kD. No obstante, en el caso de otros polipéptidos terapéuticos, por ejemplo anticuerpos de cadena sencilla, que normalmente tienen un peso molecular de 25 kD, dichos agregados tendrían un peso molecular superior a aproximadamente 25 kD.

La expresión “producto de degradación del polipéptido de bajo peso molecular” incluye, por ejemplo, fragmentos del polipéptido terapéutico realizados mediante, por ejemplo, desamidación o hidrólisis. Normalmente, los productos de degradación de bajo peso molecular son complejos que tienen un peso molecular inferior al del polipéptido monomérico terapéutico. En el caso de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo IgG, dichos productos de degradación son menores que aproximadamente 150 kD. No obstante, en el caso de otros polipéptidos terapéuticos, por ejemplo anticuerpos de cadena sencilla, que normalmente tienen un peso molecular de 25 kD, dichos agregados tendrían un peso molecular inferior a aproximadamente 25 kD.

La expresión “vía de administración” incluye las vías de administración reconocidas en la técnica para liberar un polipéptido terapéutico tal como, por ejemplo, las vías parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracraneal o epidural. Para la administración de un polipéptido terapéutico para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa se pueden desear las vías intravenosa, epidural o intracraneal.

El término “tratamiento”, como se usa en el presente documento, se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico a un paciente o la aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido o línea celular aislados de un paciente que tiene una enfermedad, un síntoma de enfermedad o una predisposición a una enfermedad, con el fin de curar, sanar, aliviar, retrasar, aliviar, alterar, remediar, atenuar, mejorar o afectar a la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición a la enfermedad.

El término “dosis eficaz” o “dosificación eficaz” se define como una cantidad suficiente para conseguir o al menos conseguir parcialmente el efecto deseado. La expresión “dosis terapéuticamente eficaz” se define como una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya padece la enfermedad. Cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la infección y el estado general del propio sistema inmunológico del paciente.

El término “paciente” incluye sujetos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico.

El término “forma de unidad de dosificación” (o “forma farmacéutica unitaria”) como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente pequeñas adecuadas como dosificaciones unitarias para el paciente que se va a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo, diluyente o excipiente farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas de unidad de dosificación están dictadas y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico concreto que se debe conseguir y de las limitaciones inherentes en la técnica de formar tal compuesto activo para el tratamiento de pacientes.

Los niveles de dosificación reales del principio activo (por ejemplo, polipéptidos A β) en las formulaciones de la presente invención se pueden variar para obtener una cantidad del principio activo que es eficaz para alcanzar la respuesta terapéutica deseada para un paciente concreto, composición y modo de administración sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de diversos factores farmacocinéticas, incluyendo, entre otros, la actividad del compuesto concreto de la presente invención usado, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto concreto usado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones concretas usadas, la edad, el sexo, el peso, el estado de salud general y el historial médico previo del paciente que se esté tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

El término “diluyente”, como se usa en el presente documento, se refiere a una solución adecuada para alterar o conseguir una concentración o concentraciones de ejemplo como se describen en el presente documento.

Visión general

La presente divulgación proporciona formulaciones para polipéptidos de unión a A β , en concreto anticuerpos anti A β , así como porciones y/o fragmentos de los mismos. En ciertos aspectos, la divulgación proporciona formulaciones de polipéptidos líquidas estabilizadas para uso terapéutico. En concreto, la divulgación proporciona la estabilización de polipéptidos de unión a A β , por ejemplo anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, para el uso en el tratamiento de enfermedades amiloidogénicas y/o trastornos. En concreto, la divulgación proporciona formulaciones que se estabilizan de modo tal que el polipéptido terapéutico activo es estable en un periodo de tiempo extendido y se puede administrar a través de varias vías de administración. Esto es especialmente crucial para los polipéptidos de unión a A β (por ejemplo anticuerpos) destinados para usar en el tratamiento de enfermedades y/o trastornos amiloidogénicos. En otros aspectos, la divulgación proporciona una formulación de anticuerpo estable de forma única que, por ejemplo, es estable a varias tensiones, tales como

congelación, liofilización, calor y/o reconstitución. Además, las formulaciones de ejemplo son capaces de mantener la estabilidad, actividad biológica, pureza y calidad del anticuerpo en un periodo de tiempo extendido (por ejemplo, un año o más durante el cual se almacena la formulación) e incluso a temperaturas desfavorables. Además, formulaciones de ejemplo son adecuadas para la administración a un sujeto o paciente (p. ej., administración intravenosa a un sujeto o paciente), por ejemplo un ser humano que tiene o se cree que tiene una enfermedad o trastorno amiloidogénico.

Formulaciones

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una formulación estabilizada que incluye un polipéptido de unión a A β , un agente de tonicidad, estando el agente de tonicidad presente en una cantidad suficiente para hacer que la formulación estabilizada sea adecuada para infusión intravenosa, y un aminoácido o derivado de aminoácido, estando el aminoácido o derivado de aminoácido presente en una cantidad suficiente para mantener un pH fisiológicamente adecuado. La presente divulgación proporciona una formulación estabilizada que incluye un anticuerpo anti-A β , manitol e histidina.

La presente divulgación proporciona una formulación estabilizada que incluye un polipéptido de unión a A β , un agente de tonicidad, estando el agente de tonicidad está presente en una cantidad suficiente para hacer que la formulación sea adecuada para infusión intravenosa, y un aminoácido o derivado de aminoácido, estando el aminoácido o derivado de aminoácido presente en una cantidad suficiente para mantener un pH fisiológicamente adecuado. El agente de tonicidad es manitol. El aminoácido es histidina.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una formulación estabilizada que incluye un polipéptido de unión a A β . Los polipéptidos de unión a A β adecuados para estabilización en una formulación de la divulgación incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos, y, en particular, anticuerpos capaces de unirse a un agente terapéutico implicado en enfermedades o trastornos amiloidogénicos. De acuerdo con esto, los polipéptidos terapéuticos se estabilizan para evitar la formación de subproductos, normalmente agregados de alto peso molecular, fragmentos de degradación de bajo peso molecular o una mezcla de los mismos, mediante la adición de un antioxidante en una cantidad suficiente para inhibir la formación de dichos subproductos. Los agentes antioxidantes incluyen metionina y análogos de la misma, a concentraciones suficientes para obtener la inhibición deseada de subproductos no deseados como se ha tratado anteriormente. Opcionalmente, las formulaciones polipeptídicas estabilizadas además comprenden un agente de tonicidad, en las que el agente de tonicidad está presente en una cantidad suficiente para hacer que la formulación estabilizada sea adecuada para varias vías de administración, por ejemplo infusión intravenosa, y un aminoácido o derivado del mismo, estando el aminoácido o derivado del mismo presente en una cantidad suficiente para mantener un pH fisiológicamente adecuado. La presente divulgación proporciona una formulación estabilizada que incluye un anticuerpo anti-A β , metionina, manitol e histidina.

La presente divulgación proporciona una formulación líquida estabilizada que incluye un polipéptido de unión a A β , terapéuticamente activo, teniendo el polipéptido capacidad de formación de subproductos durante el almacenamiento, y un antioxidante, estando el antioxidante está presente en una cantidad suficiente para reducir la formación de subproductos durante el almacenamiento de la formulación. El antioxidante es metionina o un análogo de la misma.

El polipéptido de unión a A β se selecciona del grupo constituido por un anticuerpo, un fragmento Fv del anticuerpo, un fragmento Fab del anticuerpo, un fragmento Fab'(2) de anticuerpo, un fragmento Fd de anticuerpo, un anticuerpo monocatenario (scFv), un fragmento del anticuerpo de dominio único (Dab), un polipéptido plegado en lámina beta que incluye al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo y un polipéptido no globular que incluye al menos una CDR del anticuerpo de un anticuerpo anti-A β . El polipéptido de unión a A β puede estar presente de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 60 mg/ml. Las formulaciones de la presente divulgación incluyen el polipéptido de unión a A β presente en de aproximadamente 30 mg/ml. Además, las formulaciones de la presente divulgación incluyen el polipéptido de unión a A β en aproximadamente 20 mg/ml. Las formulaciones de la presente divulgación pueden incluir el polipéptido de unión a A β en aproximadamente 17 mg/ml.

El polipéptido de unión a A β es un anticuerpo anti A β . El anticuerpo A β se puede seleccionar del grupo constituido por un anticuerpo 3D6 humanizado, un anticuerpo 10D5 humanizado, un anticuerpo 12B4 humanizado, un anticuerpo 266 humanizado, un anticuerpo 12A11 humanizado y un anticuerpo 15C11 humanizado. El anticuerpo anti-A β se une a un epítipo que incluye restos de aminoácidos de A β seleccionados del grupo constituido por 1-7,1-5, 3-7,3-6,13-28,16-21,19-22,33-40 y 33-42. El anticuerpo anti-A β puede ser de un subtipo seleccionado del grupo constituido por IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humana. El anticuerpo anti-A β es de un subtipo de IgG1 humano.

El polipéptido A β puede tener capacidad para formar un subproducto seleccionado del grupo constituido por un agregado polipeptídico de peso molecular alto, un producto de degradación del polipéptido de bajo peso molecular y combinaciones de los mismos. Los agregados de peso molecular alto pueden incluir complejos de anticuerpo, complejos de anticuerpo:fragmento de anticuerpo, complejos de fragmento de anticuerpo:fragmento de anticuerpo y combinaciones de los mismos. El producto de degradación del polipéptido de bajo peso molecular puede incluir una cadena ligera de anticuerpo, una cadena pesada de anticuerpo, un complejo de cadena ligera y de cadena pesada

de anticuerpo, un fragmento de anticuerpo y combinaciones de los mismos.

Una formulación líquida de acuerdo con la presente invención incluye un anticuerpo anti-A β , manitol e histidina. El anticuerpo anti-A β es un anticuerpo 3D6 humanizado. El anticuerpo anti-A β se une a un epítipo que incluye restos de aminoácidos de A β seleccionados del grupo constituido por 1-7, 1-5, 3-7, 3-6, 13-28, 16-21, 19-22, 33-40, y 33-42. El anticuerpo es del subtipo IgG1.

El anticuerpo anti A β puede estar presente de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml. El anticuerpo anti-A β está presente en de aproximadamente 20 mg/ml.

Las formulaciones de la presente divulgación incluyen manitol en una cantidad suficiente para mantener la isotonicidad de la formulación. El manitol puede estar presente de aproximadamente 2 % en p/v a aproximadamente 10 % en p/v, por ejemplo en aproximadamente 4 % en p/v o en aproximadamente 6 % en p/v, o en aproximadamente 10 % en p/v.

Las formulaciones de la presente divulgación incluyen histidina en una cantidad suficiente para mantener un pH fisiológicamente adecuado. La histidina puede estar presente de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 25 mM, por ejemplo en aproximadamente 10 mM.

Las formulaciones de la presente divulgación incluyen succinato de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 25 mM, por ejemplo en aproximadamente 10 mM.

Las formulaciones de la presente divulgación incluyen además un antioxidante. El antioxidante es metionina o un análogo de la misma. La metionina o análogo está presente en de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 25 mM, por ejemplo en aproximadamente 10 mM.

La formulación incluye además un estabilizador. Dicho estabilizador es polisorbato 80. El polisorbato 80 puede estar presente de aproximadamente 0,001% en p/v a aproximadamente 0,01% en p/v. En otras realizaciones, el polisorbato 80 está presente en de aproximadamente 0,005% en p/v. En otras realizaciones más de la presente invención, el polisorbato 80 está presente en de aproximadamente 0,01% en p/v.

La formulación tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0, de aproximadamente 6,2 o de aproximadamente 6,5.

La formulación puede ser estable durante la congelación. La formulación puede ser adecuada para administración intravenosa. La formulación puede ser adecuada para administración intramuscular o subcutánea. La formulación puede ser adecuada para liberación en el cerebro de un sujeto.

La formulación puede ser adecuada para liberación en el líquido cefalorraquídeo de un sujeto. La formulación puede carecer sustancialmente de conservantes.

La formulación es estable durante al menos 12 meses. La formulación es estable durante al menos 18 meses. La formulación es estable durante al menos 24 meses. La formulación es estable durante al menos 30 meses.

La formulación es estable de aproximadamente -80 °C a aproximadamente 40 °C. La formulación es estable de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 25 °C. Preferentemente, la formulación es estable de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C.

Una formulación adecuada para administración intravenosa incluye aproximadamente 20 mg/ml del anticuerpo anti A β , L-histidina aproximadamente 10 mM, metionina aproximadamente 10 mM, aproximadamente 4 % de manitol y tiene un pH de aproximadamente 6. Una formulación adecuada para administración intravenosa incluye aproximadamente 30 mg/ml del anticuerpo anti A β , succinato aproximadamente 10 mM, metionina aproximadamente 10 mM, aproximadamente 6 % de manitol y tiene un pH de aproximadamente 6,2. Una formulación preferida adecuada para administración intravenosa incluye aproximadamente 20 mg/ml del anticuerpo anti A β , histidina aproximadamente 10 mM, metionina aproximadamente 10 mM, aproximadamente 4 % de manitol, aproximadamente 0,005 % de polisorbato 80 y tiene un pH de aproximadamente 6. Una formulación adecuada para administración intravenosa incluye aproximadamente 10 mg/ml del anticuerpo anti A β , -histidina aproximadamente 10 mM, metionina aproximadamente 10 mM, aproximadamente 10 % de manitol y 0,005 % de polisorbato 80 y tiene un pH de aproximadamente 6,5.

El anticuerpo A β se selecciona del grupo constituido por un anticuerpo 3D6 humanizado, un anticuerpo 10D5 humanizado, un anticuerpo 12B4 humanizado, un anticuerpo 266 humanizado, un anticuerpo 12A11 humanizado y un anticuerpo 15C11 humanizado. El anticuerpo anti-A β se une a un epítipo en los restos de aminoácidos de A β seleccionados del grupo constituido por 1-7, 1-5, 3-7, 3-6, 13-28, 16-21, 19-22, 33-40, y 33-42 de A β . En algunas formulaciones, el anticuerpo anti A β se une a un epítipo discontinuo que incluye restos en 1-7 y en 13-28 de A β . En algunas de estas formulaciones, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo fabricado mediante el procedimiento descrito en la publicación de patente internacional nº WO03/070760. En algunas de estas formulaciones, el epítipo es un epítipo discontinuo.

En otro aspecto de la presente invención, una forma farmacéutica unitaria incluye una cantidad eficaz de la formulación de cualquiera de las realizaciones anteriores para tratar la enfermedad en un paciente mediante administración de la forma farmacéutica al paciente. En un ejemplo de realización, la forma farmacéutica unitaria es un contenedor que contiene una formulación de acuerdo con la presente invención. El contenedor puede ser un vial que contiene de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2.000 mg del polipéptido de unión a A β . El vial puede contener de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 1.500 mg del polipéptido de unión a A β . El vial puede contener de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 50 mg del polipéptido de unión a A β .

El vial puede tener un volumen de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 ml. El vial puede tener un volumen de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 ml.

En algunas realizaciones, una forma farmacéutica unitaria de acuerdo con la presente invención es adecuada para infusión intravenosa a un paciente.

En el presente documento también se describen kits que incluyen una forma farmacéutica unitaria, como la descrita en el presente documento, e instrucciones de uso. En una realización de la presente invención, un contenedor que incluye la forma farmacéutica unitaria es un contenedor marcado para usar. El contenedor puede estar marcado para uso profiláctico. El contenedor puede estar marcado para uso terapéutico.

La presente divulgación proporciona un procedimiento para aumentar la estabilidad de un polipéptido de unión a A β en una formulación farmacéutica líquida, en la que el polipéptido exhibe formación de subproducto durante el almacenamiento en una formulación líquida, incluyendo el procedimiento incorporar en la formulación un antioxidante en una cantidad suficiente para reducir la cantidad de formación de subproducto del polipéptido. El componente polipeptídico de unión a A β se selecciona del grupo constituido por un anticuerpo, un fragmento Fv del anticuerpo, un fragmento Fab del anticuerpo, un fragmento Fab'(2) de anticuerpo, un fragmento Fd de anticuerpo, un anticuerpo monocatenario (scFv), un fragmento del anticuerpo de dominio único (Dab), un polipéptido plegado en lámina beta que incluye al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo y un polipéptido no globular que incluye al menos una CDR del anticuerpo de un anticuerpo anti-A β . El subproducto se selecciona del grupo constituido por un agregado polipeptídico de peso molecular alto, un producto de degradación del polipéptido de bajo peso molecular y combinaciones de los mismos. El antioxidante se selecciona del grupo constituido por metionina y un análogo de la misma.

Un procedimiento para preparar una formulación de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la presente divulgación incluye combinar los excipientes de la formulación. Un procedimiento para preparar la formulación de acuerdo con cualquiera de los aspectos incluye combinar el polipéptido de unión a A β con uno o más diluyentes, incluyendo el uno o más diluyentes los excipientes de la formulación.

Un procedimiento para preparar una forma farmacéutica unitaria incluye combinar la formulación de cualquiera de los aspectos anteriores en un contenedor adecuado. Un procedimiento para preparar la formulación de cualquiera de los aspectos anteriores incluye combinar una solución que incluye el polipéptido de unión a A β y al menos una porción de los excipientes de la formulación con un diluyente que incluya el resto de los excipientes.

Polipéptidos para usar en las formulaciones estabilizadas de la invención

El anticuerpo que se va a formular de acuerdo con la invención, como se ha descrito en el presente documento, se prepara usando técnicas que están bien establecidas en la materia e incluyen, por ejemplo, técnicas sintéticas (tales como técnicas recombinantes y síntesis peptídica o una combinación de estas técnicas) o se pueden aislar de una fuente endógena del polipéptido. Técnicas para la producción de anticuerpos se describen más adelante.

Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se pueden preparar inmunizando un sujeto adecuado con un inmunógeno. El título del anticuerpo en el sujeto inmunizado se puede monitorizar en el tiempo mediante técnicas estándar, tal como con un ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA) usando antígeno diana inmovilizado. Si se desea, las moléculas de anticuerpo dirigidas contra el antígeno diana se pueden aislar del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y purificar adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de Sefarosa en proteína A para obtener el anticuerpo, por ejemplo la fracción de IgG. En un momento adecuado tras la inmunización, por ejemplo cuando los títulos del anticuerpo anti-antígeno son más altos, las células productoras de anticuerpo se pueden obtener del sujeto y usar para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas estándar, tal como la técnica del hibridoma descrita inicialmente por Kohler y Milstein (1975) Nature 256:495-497) (véase también, Brown y col. (1981) J. Immunol. 127:539-46; Brown et al. (1980) J. Biol. Chem. 255:4980-83; Yeh y col. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 2927-31; y Yeh y col. (1982) Int. J. Cancer 29:269-75). Para la preparación de anticuerpos policlonales quiméricos, véase Buechler y col. y la patente de EE.UU. nº 6,420,113.

Anticuerpos monoclonales

Para el fin de generar un anticuerpo monoclonal (véase, por ejemplo, G. Galfre y col.) se puede aplicar cualquiera de los muchos protocolos bien conocidos usados para fusionar linfocitos y líneas celulares inmortalizadas. (1977)

Nature 266:55052; Gefter y col. Somatic Cell Genet., citado ant.; Lerner, Yale J. Biol. Med., citado ant.; Kenneth, Monoclonal Antibodies, citado ant.). Además, el experto en la técnica apreciará que hay muchas variaciones de dichos procedimientos que también serían útiles. Normalmente, la línea celular inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma) deriva de la misma especie de mamífero que los linfocitos. Por ejemplo, se pueden fabricar hibridomas murinos fusionando linfocitos de un ratón inmunizado con una preparación inmunogénica de la presente divulgación con una línea celular de ratón inmortalizada. Las líneas celulares inmortales preferidos son líneas celulares de mieloma de ratón que son sensibles al medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterinina y timidina ("medio HAT"). Cualquiera de una serie de líneas celulares de mieloma se puede usar como pareja de fusión de cuerdo con las técnicas estándar, por ejemplo las líneas celulares P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8,653 o Sp2/O-Ag14. Estas líneas de mieloma están disponibles en la ATCC. Normalmente, las células de mieloma de ratón sensibles a HAT se fusionan con esplenocitos de ratón usando polietilenglicol glycol ("PEG"). Las células de hibridoma que resultan de la fusión se seleccionan después usando medio HAT, que mata las células de mieloma fusionadas de forma improductiva y no fusionadas (los esplenocitos no fusionados mueren tras varios días porque no están transformadas). Las células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal de la divulgación se detectan mediante detección selectiva de sobrenadantes de cultivo de hibridoma por anticuerpos que se unen al antígeno diana, por ejemplo A β , usando un ensayo ELISA estándar.

Anticuerpos recombinantes

Una alternativa a la preparación de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales se puede identificar un anticuerpo monoclonal y aislar mediante detección selectiva de una biblioteca de inmunoglobulina combinatoria recombinante (por ejemplo, una biblioteca de expresión de anticuerpos en fagos) con un antígeno diana para aislar de este modo los miembros de bibliotecas de inmunoglobulinas aisladas que se unen al antígeno diana. Las kits para generar y seleccionar bibliotecas de expresión en fagos están disponibles comercialmente (por ejemplo, Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, n^o de cat. 27-9400-01; y el kit de expresión en fagos Stratagene SurfZap™ n^o de cat. 240612). Adicionalmente, ejemplos de procedimientos y reactivos particularmente favorables para usar en la generación y detección selectiva de bibliotecas de expresión de anticuerpos se pueden encontrar en, por ejemplo, Ladner y col., la patente de EE.UU. 5.223.409; Kang y col. La publicación internacional PCT N^o WO 92/18619; Dower y col. La publicación internacional PCT N^o WO 91/17271; Winter y col. La publicación internacional PCT N^o WO 92/20791; Markland y col. La publicación internacional PCT N^o WO 92/15679; Breitling y col. La publicación internacional PCT N^o WO 93/01288; McCafferty y col. La publicación internacional PCT N^o WO 92/01047; Garrard y col. La publicación internacional PCT N^o WO 92/09690; Ladner y col. La publicación internacional PCT N^o WO 90/02809; Fuchs y col. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay y col. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85; Huse y col. (1989) Science 246:1275-1281; Griffiths y col. (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins y col. (1992) J. Mol. Biol. 226:889-896; Clarkson, y col. (1991) Nature 352:624-628; Gram y col. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580; Garrad, y col. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom y col. (1991) Nuc. Acid Res. 19:4133-4137; Barbas y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982; y McCafferty y col. Nature (1990) 348:552-554.

Anticuerpos quiméricos y humanizados

Adicionalmente se describen anticuerpos recombinantes, como los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden porciones humanas y no humanas, que se pueden preparar usando técnicas de ADN recombinantes estándar.

La expresión "inmunoglobulina humanizada" o "anticuerpo humanizado" se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo que incluye al menos una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo humanizado (es decir, al menos una cadena ligera o pesada humanizada). La expresión "cadena de inmunoglobulina humanizada" o "cadena de anticuerpo humanizado" (es decir, una "cadena ligera de inmunoglobulina humanizada" o "cadena pesada de inmunoglobulina humanizada") se refiere a una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo (es decir, una cadena ligera o pesada, respectivamente), que tiene una región variable que incluye una región de marco variable sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano y regiones determinantes de la complementariedad (CDR) (por ejemplo, al menos una CDR, preferentemente dos CDR, más preferentemente tres CDR) sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano, y además incluye regiones constantes (por ejemplo, al menos una región constante o porción de la misma, en el caso de una cadena ligera, y tres regiones constantes en el caso de una cadena pesada). La expresión "región variable humanizada" (por ejemplo, "región variable de la cadena ligera humanizada" o "región variable de la cadena pesada humanizada") se refiere a una región variable que incluye una región de marco variable sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano y regiones determinantes de la complementariedad (CDR) sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano.

La expresión "sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano" o "sustancialmente humano" significa que, cuando se alinean con una secuencia de aminoácidos de la inmunoglobulina o anticuerpo humano a efectos de comparación, la región comparte al menos una identidad del 80-90%, 90-95% o 95-99% (es decir, la identidad de la secuencia local) con la región constante o de marco humano, lo que permite, por ejemplo, sustituciones conservadoras, sustituciones de la secuencia consenso, sustituciones de la línea germinal, mutaciones inversas y similares. La introducción de sustituciones conservadoras, sustituciones de la secuencia consenso, sustituciones de la línea germinal, mutaciones inversas y similares a menudo se denomina "optimización de un anticuerpo o cadena

humanizado. La expresión “sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano” o “sustancialmente no humano” significa que tiene una secuencia de la inmunoglobulina o anticuerpo con una identidad de al menos 80-95%, preferentemente al menos 90-95%, más preferentemente 96%, 97%, 98%, o 99% con la de un organismo no humano, por ejemplo un mamífero no humano.

- 5 De acuerdo con esto, todas las regiones o restos de una inmunoglobulina o anticuerpo humanizada o de una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo humanizado, excepto las CRD, son sustancialmente idénticas a las correspondientes regiones o restos de una o más secuencias de inmunoglobulina nativa. La expresión “región correspondiente” o “resto correspondiente” se refiere a una región o resto de una segunda secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que ocupa la misma (es decir, equivalente) posición que una región o resto en una
10 primera secuencia de aminoácidos o de nucleótidos, cuando las secuencias primera y segunda se alinean óptimamente con fines de comparación.

La expresión “identidad significativa” significa que dos secuencias polipeptídicas, cuando se alinean óptimamente, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando los pesos de hueco por defecto, comparten una identidad de secuencia de al menos 50-60%, preferentemente una identidad de secuencia de al menos 60-70%, más
15 preferentemente identidad de secuencia de al menos 70-80%, más preferentemente una identidad de secuencia de al menos 80-90%, incluso más preferentemente una identidad de secuencia de al menos 90-95% e incluso más preferentemente una identidad de secuencia de al menos 95 % o más (por ejemplo, una identidad de secuencia del 99 %). La expresión “identidad sustancial” significa que dos secuencias polipeptídicas, cuando están alineadas óptimamente, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten
20 una identidad de secuencia de al menos 80-90%, preferentemente una identidad de secuencia de al menos 90-95%, y más preferentemente una identidad de secuencia de al menos 95 % o más (por ejemplo, una identidad de secuencia del 99 % o más). Para comparar secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias problema. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias problema y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de la subsecuencia, en caso necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. A
25 continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) problema con respecto a la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa designados.

La alineación óptima de secuencias para comparación se puede efectuar mediante, por ejemplo, el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482, el algoritmo de alineación por homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443, mediante el procedimiento de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (véase, en general, Ausubel
30 y col., Current Protocols in Molecular Biology). Otro ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul y col. J. Mol. Biol. 215:403 (1990). El software para realizar análisis BLAST está disponible para el público a través del National Center for Biotechnology Information (accesible para el público a través del servidor de Internet del National Institutes of Health NCBI). Normalmente, los parámetros por defecto del programa se pueden usar para realizar la comparación de secuencias, aunque también se pueden usar parámetros adaptados. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como parámetros por defecto una longitud de texto (W) de 3, y una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

Preferentemente, las posiciones de los restos que no son idénticas difieren en sustituciones conservadoras de aminoácidos. Con el fin de clasificar las sustituciones de aminoácidos como conservadoras o no conservadoras, los aminoácidos se agrupan del siguiente modo: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): leu, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (restos que influyen sobre la orientación de la cadena): gly, pro; Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservadoras implican
50 sustituciones entre aminoácidos de la misma clase. Las sustituciones no conservadoras constituyen el intercambio de un miembro de una de estas clases con un miembro de otra clase.

Preferentemente, las inmunoglobulinas o anticuerpos humanizados se unen al antígeno con una afinidad que está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco del correspondiente anticuerpo no humanizado. Por ejemplo, si el anticuerpo no humanizado tiene una afinidad de unión de 10^{-9} M, los anticuerpos humanizados tendrán una afinidad de unión de al menos 3×10^{-8} M, 4×10^{-8} M, 5×10^{-8} M, o 10^{-9} M. Al describir las propiedades de unión de una inmunoglobulina o anticuerpo, la cadena se puede describir en base a su capacidad para “dirigir la unión al antígeno (por ejemplo, A β)”. Se dice que una cadena “dirige la unión al antígeno” cuando confiere a una inmunoglobulina o anticuerpo intacto (o fragmento de unión a antígeno del mismo) una propiedad de unión específica o afinidad de unión. Se dice que una mutación (por ejemplo, una retromutación) afecta sustancialmente a la capacidad de una
60 cadena pesada o ligera de dirigir la unión al antígeno si afecta a (por ejemplo, reduce) la afinidad de unión de una inmunoglobulina o anticuerpo intacto (o fragmento de unión a antígeno del mismo) que comprende dicha cadena al menos en un orden de magnitud en comparación con la del anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo)

que comprende una cadena equivalente que carece de dicha mutación. Una mutación “no afecta sustancialmente (por ejemplo, reduce) a la capacidad de una cadena de dirigir la unión al antígeno” si afecta a (por ejemplo, reduce) la afinidad de unión de una inmunoglobulina o anticuerpo intacto (o fragmento de unión a antígeno del mismo) que comprende dicha cadena sólo en un factor de dos, tres o cuatro con respecto a la del anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo) que comprende una cadena equivalente que carece de dicha mutación.

La expresión anticuerpo o “inmunoglobulina quimérica” se refiere a un anticuerpo o inmunoglobulina cuyas regiones variables proceden de una primera especie y cuyas regiones constantes proceden de una segunda especie. Pueden construirse inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, por ejemplo, por ingeniería genética, a partir de segmentos génicos de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Con las expresiones “inmunoglobulina humanizada” o “anticuerpo humanizado” no se pretende abarcar las inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, como se define más adelante. Aunque las inmunoglobulinas o anticuerpos humanizados son quiméricos en su construcción (es decir, comprenden regiones de más de una especie de proteína), incluyen características adicionales (es decir, regiones variables que comprenden restos de CDR donadoras y restos de regiones de marco aceptoras) no encontradas en las inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, como se define en el presente documento.

Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la material, por ejemplo usando procedimientos descritos en Robinson y col. La publicación internacional PCT N PCT/US86/02269; Akira, y col. Solicitud de patente europea 184,187; Taniguchi, M., Solicitud de patente europea 171,496; Morrison y col. Solicitud de patente europea . 173,494; Neuberger y col. La publicación internacional PCT N° WO 86/01533; Cabilly y col. La patente de EE.UU. n° 4,816,567; Cabilly y col. Solicitud de patente europea . 125,023; Better y col. (1988) Science 240:1041-1043; Liu y col. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu y col. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sun y col. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura y col. (1987) Canc. Res. 47:999-1005; Wood y col. (1985) Nature 314:446-449; y Morrison, y col. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, S. L. (1985) Science 229:1202-1207; Oi y col. (1986) BioTechniques 4:214; Winter patente de EE.UU. 5,225,539; Jones y col. (1986) Nature 321:552-525; Verhoeyan y col. (1988) Science 239:1534; y Beidler y col. (1988) J. Immunol. 141:4053-4060.

Anticuerpos humanos de animales transgénicos y expresión en fagos

Como alternativa, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, por inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen la región de unión de la cadena pesada de anticuerpo (JH) en ratones mutantes quiméricos y de la línea germinal tiene como resultado la inhibición de producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal tiene como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 6.150.584; 6.114.598; y 5.770.429.

Los anticuerpos completamente humanos también se pueden obtener en bibliotecas de expresión en fagos (Hoogenboom y col., J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks y col., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)). Los anticuerpos policlonales quiméricos también se pueden obtener en bibliotecas de expresión en fagos (Buechler y col., patente de EE.UU. n° 6.420.113).

Anticuerpos biespecíficos. Polipéptidos de fusión de anticuerpo y anticuerpos de cadena sencilla

Los anticuerpos biespecíficos (BsAb) son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes. Dichos anticuerpos pueden obtenerse de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos de F(ab)²). Los procedimientos de fabricación de anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. Tradicionalmente, la producción de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la co-expresión de dos pares de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, en las que las dos cadenas H tienen diferentes especificidades de unión (Millstein y col. Nature, 305:537-539 (1983)). Dada la clasificación aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos híbridos (cuadrotas) producen una potencial mezcla de diferentes moléculas de anticuerpo (véase el documento WO 93/08829 y en Traunecker y col., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)).

Los anticuerpos biespecíficos también incluyen anticuerpos “heteroconjugados” o reticulados. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina u otra capacidad de carga. Los anticuerpos heteroconjugados pueden fabricarse usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se divulgan en la patente de EE.UU. n° . 4,676,980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

El anticuerpo se puede fusionar, química o genéticamente, a una carga tal como un resto reactivo, detectable o funcional, por ejemplo una inmunotoxina para producir un polipéptido de fusión al anticuerpo. Dichas cargas incluyen, por ejemplo, inmunotoxinas, quimioterapéuticos y radioisótopos, todos ellos bien conocidos en la técnica.

Los anticuerpos de cadena sencilla son también adecuados para estabilización de acuerdo con la invención. Los

fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) con un engarce, que permite que cada región variable se enfrenten entre sí y recreen el bolsillo de unión a antígeno del anticuerpo parental del que proceden las regiones VL y VH. Véase Gruber y col., J. Immunol., 152:5368 (1994).

- 5 Se entiende que cualquiera de las moléculas polipeptídicas anteriores, solas o en combinación, son adecuadas para la preparación como formulaciones estabilizadas de acuerdo con la invención.

Anticuerpos anti-A β

En general, las formulaciones de la presente divulgación incluyen diversos anticuerpos para tratar enfermedades amiloidogénicas, en particular la enfermedad de Alzheimer, al dirigirse al péptido A β .

- 10 Las expresiones "anticuerpo A β ", "anticuerpo anti-A β " y "anti-A β " se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a un anticuerpo que se une a uno o más epítomos o determinantes antigénicos de la proteína precursora amiloide (APP), la proteína A β o ambos. Epítomos o determinantes antigénicos de ejemplos se pueden encontrar en la APP, pero preferentemente se encuentran en el péptido A β de la APP. Existen múltiples isoformas de APP, por ejemplo, APP695, APP751 y APP770. A los aminoácidos dentro de APP se les asignan números de acuerdo con la secuencia de la isoforma APP770 (véase, por ejemplo, GenBank, N^o de Acceso P05067). Ejemplos de isotipos específicos de la PPA que actualmente se sabe que existen en seres humanos son el polipéptido de 695 aminoácidos descrito por Kang y col. (1987) Nature 325:733-736 que se denomina la "APP normal"; el polipéptido de 751 aminoácidos descrito por Ponte y col. (1988) Nature 331:525-527 (1988) y Tanzi y col. (1988) Nature 331:528-530; y el polipéptido de 770 aminoácidos descrito por Kitaguchi y col. (1988) Nature 331:530-532. Como resultado de procesamiento proteolítico de la APP mediante diferentes enzimas secretasa in vivo o in situ, el A β se encuentra en una "forma corta", de 40 aminoácidos de longitud, y una "forma larga", que varía de from 42-43 aminoácidos de longitud. La forma corta, A β 40, consiste en los restos 672-711 de APP. La forma larga, por ejemplo A β 42 o A β 43, consiste en los restos 673-713 o 672-714 de APP, respectivamente. Parte del dominio hidrófobo de la APP se encuentra en el extremo carboxi del A β y puede ser el responsable de la capacidad de A β para agregarse, particularmente en el caso de la forma larga. El péptido A β se puede encontrar, o purificarse, en los fluidos corporals de seres humanos y otros mamíferos, por ejemplo líquido cefalorraquídeo, incluidos de individuos normales y de individuos que sufren trastornos amiloidogénicos.

- Las expresiones "proteína β -amiloide", "péptido β -amiloide", " β -amiloide", "A β " y "péptido A β " se usan indistintamente en el presente documento. El péptido A β (por ejemplo, A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 y A β 43) es un fragmento interno de <4 kDa de 39-43 aminoácidos de APP. A β 40, por ejemplo, consiste en los restos 672-711 de APP y A β 42 consiste en los restos 673-713 de APP. Péptidos A β incluyen péptidos resultantes de la escisión por secretasas de APP y los péptidos sintéticos que tienen la misma, o esencialmente la misma secuencia, que los productos de escisión. Los péptidos A β pueden proceder de varias Fuentes, por ejemplo tejidos, líneas celulares o fluidos corporals (por ejemplo, sueros o líquido cefalorraquídeo). Por ejemplo, un A β puede proceder de células que expresan APP tal como células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas de forma estable con APP717V→F, como se ha descrito en, por ejemplo, Walsh y col. (2002), Nature, 416, pp 535-539, Una preparación de A β puede proceder de Fuentes tisulares usando procedimientos descritos anteriormente (véase, por ejemplo, Johnson-Wood y col., (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1550). Como alternativa, los péptidos A β se puede sintetizar usando procedimientos que son muy conocidos para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Fields y col., Synthetic Peptides: A User's Guide, ed. Grant, W.H. Freeman & Co., New York, NY, 1992, p 77). Por tanto, los péptidos se pueden sintetizar usando las técnicas de Merrifield automáticas de síntesis en fase sólida con el grupo α -amino protegido por química t-Boc o F-moc usando aminoácidos protegidos de cadena lateral, por ejemplo un Applied Biosystems Peptide Synthesizer Modelo 430A o 431. Se pueden sintetizar antígenos peptídicos más largos usando técnicas de ADN recombinantes conocidas. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica el péptido o el péptido de fusión se puede sintetizar o clonar molecularmente e insertar en un vector de expresión adecuado para la transfección y expresión heteróloga en una célula huésped adecuada. El péptido A β también se refiere a secuencias de A β relacionadas que son el resultado de mutaciones en la región A β del gen normal.

- Epítomos o determinantes antigénicos de ejemplo a los que se une un anticuerpo de A β se pueden encontrar en la proteína precursora amiloide humana (APP), pero preferentemente se encuentran en el péptido A β de la APP. Epítomos o determinantes antigénicos de ejemplo dentro de A β se localizan en el extremo N, región central, o extremo C de A β . Un "epítomo en N-terminal" es un epítomo o determinante antigénico localizado dentro de o incluyendo el extremo N del péptido A β . Ejemplos de epítomos en N-terminal incluyen restos dentro de los aminoácidos 1-10 o 1-12 de A β , preferentemente de los restos 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 o 3-7 de A β 42. Otros epítomos en N-terminal de ejemplo se inician en los restos 1-3 y finalizan en los restos 37-11 de A β . Otros epítomos en N-terminal de ejemplo incluyen los restos 2-4, 5, 6, 7 u 8 de A β , los restos 3-5, 6, 7, 8 o 9 de A β o los restos 4-7, 8, 9 o 10 de A β 42. "Epítomos centrales" son epítomos o determinantes antigénicos que comprenden los restos localizados dentro de la porción central o media del péptido A β . Ejemplos de epítomos centrales incluyen los restos dentro de los aminoácidos 13-28 de A β , preferentemente de los restos 14-27, 15-26, 16-25, 17-24, 18-23, o 19-22 se A β . Otros ejemplos de epítomos centrales incluyen los restos dentro de los aminoácidos 16-24, 16-23, 16-22, 16-21, 18-21, 19-21, 19-22, 19-23, o 19-24 de A β . Epítomos centrales o determinantes antigénicos en "C-terminal" se localizan dentro, o incluyendo, el extremo C del péptido A β e incluyen los restos en los aminoácidos 33-40, 33-41, o 33-42 de A β . Los

“epítomos en C-terminal” son epítomos o determinantes antigénicos que comprenden los restos localizados en el extremo C del péptido A β (por ejemplo, dentro de aproximadamente los aminoácidos 30-40 o 30-42 de A β . Ejemplos adicionales de los epítomos o determinantes antigénicos en C-terminal incluyen los restos 33-40 o 33-42 de A β .

5 Cuando se dice que un anticuerpo se une a un epítopo en restos especificados, tales como 3-7 de A β , lo que se quiere decir es que el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que contiene los restos especificados (es decir, 3-7 de A β en este ejemplo) Dicho anticuerpo no necesariamente pone en contacto cada resto dentro de 3-7 de A β ni tampoco cada sustitución o delección de un solo aminoácido en 3-7 de A β necesariamente afecta de forma significativamente a la afinidad de unión. En varias realizaciones, un anticuerpo de A β es específico del final. Como se usa en el presente documento, la expresión “específico del final” se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a los restos en N-terminal o C-terminal de un péptido A β , pero que no reconoce los mismos restos cuando están presentes en una especie de A β más larga, que comprende los restos o en APP. Un anticuerpo de A β puede ser “específico del extremo C”. Como se usa en el presente documento, la expresión “específico del extremo C” quiere decir que el anticuerpo reconoce específicamente un péptido A β . Ejemplos de anticuerpos de A β específicos del extremo C incluyen aquellos que: reconocen un péptido A β que termina en un resto 40, pero no reconocen un péptido A β que termina en un resto 41, 41 y/o 43; reconocen un péptido A β que termina en el resto 42 pero no reconocen un péptido A β que termina en el resto 40, 41 y/o 43 etc.

El anticuerpo de A β puede ser un anticuerpo 3D6 o variante del mismo, o un anticuerpo 10D5 o variante del mismo, que se describen en la publicación de patente de EE.UU. n° 20030165496A1, publicación de patente de EE.UU. n° 20040087777A1, publicación de patente internacional n° WO02/46237A3 y publicación de patente internacional n° WO04/080419A2. La descripción de los anticuerpos 3D6 y 10D5 también se puede encontrar en la publicación de patente internacional WO02/088306A2 y publicación de patente internacional n1 WO02/088307A2, Anticuerpos 3D6 adicionales se describen en la solicitud de patente de EE.UU. N° 11/303,478 y la solicitud de patente internacional n° PCT/US05/45614. 3D6 es un anticuerpo monoclonal (mAb) que se une específicamente a un epítopo en el extremo N localizado en el péptido β -amiloide humano, específicamente a los restos 1-5. Por comparación, 10D5 es un mAb que se une específicamente a un epítopo en N-terminal localizado en el péptido β -amiloide humano, específicamente a los restos 3-6. Una línea celular productora del anticuerpo monoclonal 3D6 (RB96 3D6,32,2,4) se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, VA 20108, EE.UU., el 8 de abril de 2003 según los términos del Tratado de Budapest y tiene el número de depósito PTA-5130. Una línea celular productora del anticuerpo monoclonal 10D5 (RB44 10D5,19,21) se depositó en la ATCC el 8 de abril de 2003 según los términos del Tratado de Budapest y tiene el número de depósito PTA-5129.

Ejemplos de variantes de anticuerpos 3D6 son aquéllos que tienen, por ejemplo, una cadena ligera humanizada que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable indicadas en la SEC ID N° 3 o la SEC ID N° 5, y una cadena pesada humanizada que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable indicadas en la SEC ID N° 4 o la SEC ID N° 6. Otros Ejemplos de variantes de anticuerpos 3D6 son aquéllos que tienen, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera humanizada indicada en la SEC ID N° 7 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada indicada en la SEC ID N° 8.

Ejemplos de variantes de anticuerpos 10D5 son aquéllos que tienen, por ejemplo, una cadena ligera humanizada que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable indicadas en la SEC ID N° 9 o la SEC ID N° 11, y una cadena pesada humanizada que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable indicadas en la SEC ID N° 10 o la SEC ID N° 12. Otros Ejemplos de variantes de anticuerpos 10D5 son aquéllos que tienen, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera humanizada indicada en la SEC ID N° 13 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada indicada en la SEC ID N° 14. Dichos anticuerpos variantes se describen también en el documento WO02/088306A2.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo 12B4 o variante del mismo, como se describe en la publicación de patente de EE.UU. n° 20040082762A1 y la publicación de patente internacional n° WO03/077858A2, 12B4 es un mAb que se une específicamente a un epítomos en N-terminal localizado en el péptido β -amiloide humano, específicamente los restos 3-7.

Ejemplos de variantes de anticuerpos 12B4 son aquéllos que tienen, por ejemplo, una cadena ligera humanizada (o cadena ligera) que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable indicadas en la SEC ID N° 15 o la SEC ID N° 17 y una cadena pesada humanizada que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable indicadas en la SEC ID N° 16, SEC ID N° 18 o SEC ID N° 19.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo 12A11 o variante del mismo, como se describe en la publicación de patente de EE.UU. n° 2005011865A1, la publicación de patente de EE.UU. N° de serie 11/303,478, la publicación de patente internacional n° WO04/108895A2 y la solicitud de patente internacional n° de serie PCT/US05/45614. 12A11 es un mAb que se une específicamente a un epítopo en N-terminal localizado en el péptido β -amiloide humano, específicamente los restos 3-7.

Ejemplos de variantes de anticuerpos 12A11 son aquéllos que tienen, por ejemplo, una cadena ligera humanizada que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable indicadas en la SEC ID N° 20 y una cadena pesada humanizada que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable indicadas en las SEC ID

Nº 22, SEC ID Nº 22, SEC ID Nº 23, SEC ID Nº 24, SEC ID Nº 25, SEC ID Nº 26, SEC ID Nº 27, SEC ID Nº 28, SEC ID Nº 29, SEC ID Nº 30, SEC ID Nº 31, SEC ID Nº 32, SEC ID Nº 33, SEC ID Nº 34, SEC ID Nº 35, SEC ID Nº 36, SEC ID Nº 37, SEC ID Nº 38, SEC ID Nº 39, SEC ID Nº 40 o SEC ID Nº 41.

5 El anticuerpo puede ser un anticuerpo 6C6, o una variante del mismo, como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. nº 11/304,986 y la solicitud de patente internacional nº PCT/US05/45515 titulada "Anticuerpos humanizados que reconocen el péptido beta amiloide". 6C6 es un mAb que se une específicamente a un epítopo en N-terminal localizado en el péptido β -amiloide humano, específicamente los restos 3-7. Una línea celular productora del anticuerpo 6C6 se depositó en la ATCC el 1 de noviembre de 2005 según los términos del Tratado de Budapest y con un número de referencia asignado PTA-7200.

10 El anticuerpo puede ser un anticuerpo 2H3, como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. nº 11/304,986 y la solicitud de patente internacional nº PCT/US05/45515 titulada "Anticuerpos humanizados que reconocen el péptido beta amiloide". 2H3 es un mAb que se une específicamente a un epítopo en N-terminal localizado en el péptido β -amiloide humano, específicamente los restos 2-7.

15 En otra realización más, el anticuerpo puede ser un anticuerpo 3A3. El anticuerpo 3A3 es un mAb que se une específicamente a un epítopo en N-terminal localizado en el péptido β -amiloide humano, específicamente los restos 3-7.

20 El anticuerpo puede ser un anticuerpo 15C11, o una variante del mismo, como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. nº 11/304,986 y la solicitud de patente internacional nº WO 2006/066049 titulada "Anticuerpos humanizados que reconocen el péptido beta amiloide". 15C11 es un mAb que se une específicamente a un epítopo central localizado en el péptido β -amiloide humano, específicamente los restos 19-22.

25 El anticuerpo puede ser un anticuerpo 266 como se describe en la publicación de patente de EE.UU. nº 20050249725A1 y la publicación de patente internacional nº WO01/62801A2. 266 es un mAb que se une específicamente a un epítopo central localizado en el péptido β -amiloide humano, específicamente los restos 16-24. Una línea celular productora del anticuerpo monoclonal 266 se depositó en la ATCC el 20 de julio de 2004 y tiene el número de depósito PTA-6123.

30 Ejemplos de variantes de anticuerpos 266 son aquéllos que tienen, por ejemplo, una cadena ligera humanizada que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable indicadas en la SEC ID Nº 42 o la SEC ID Nº 44, y una cadena pesada humanizada que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable indicadas en la SEC ID Nº 43 o la SEC ID Nº 45. Otros ejemplos de variantes de anticuerpos 266 son aquéllos que tienen, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera humanizada indicada en la SEC ID Nº 46 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada indicada en la SEC ID Nº 47. Dichos anticuerpos variantes se describen también en la publicación de patente de EE.UU. nº 20050249725A1 y la publicación de patente internacional nº WO01/62801A2.

35 El anticuerpo puede ser un anticuerpo 2B1, o una variante del mismo, como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. nº 11/304,986 y la solicitud de patente internacional nº WO 2006/066049 titulada "Anticuerpos humanizados que reconocen el péptido beta amiloide". 2B1 es un mAb que se une específicamente a un epítopo central localizado en el péptido β -amiloide humano, específicamente los restos 19-23.

40 El anticuerpo puede ser un anticuerpo 1C2, o una variante del mismo, como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. nº 11/304,986/304,986 y la solicitud de patente internacional nº WO 2006/066049 titulada "Anticuerpos humanizados que reconocen el péptido beta amiloide". 1C2 es un mAb que se une específicamente a un epítopo central localizado en el péptido β -amiloide humano, específicamente los restos 16-23.

45 El anticuerpo puede ser un anticuerpo 9G8, o una variante del mismo, como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. nº 11/304,986 y la solicitud de patente internacional nº WO 2006/066049 titulada "Anticuerpos humanizados que reconocen el péptido beta amiloide". 9G8 es un mAb que se une específicamente a un epítopo central localizado en el péptido β -amiloide humano, específicamente los restos 16-21.

Las líneas celulares productoras de los anticuerpos 2B1, 1C2 y 9G8 se depositaron en la ATCC el 1 de noviembre de 2005 según los términos del Tratado de Budapest y se les asignó los números de referencia PTA-7202, PTA-7199 y PTA-7201, respectivamente.

50 Los anticuerpos que se unen específicamente a los epítopos en C-terminal localizados en el péptido β -amiloide humano para usar en la presente invención incluyen, entre otros, 369,2B, como se describe en la patente de EE.UU. nº 5,786,180, titulada "Anticuerpo monoclonal 369,2B específico del péptido β A4". Otra descripción de anticuerpos para usar en la presente invención se puede encontrar en, por ejemplo, Bussiere y col., (Am. J. Pathol. 165(3):987-95 (2004)) Bard y col. (PNAS 100(4):2023-8 (2003)), Kajkowski y col. (J. Biol. Chem. 276(22):18748-56 (2001)), Games y col. (Ann. NY Acad. Sci. 920:274-84 (2000)), Bard y col. (Nat. Med. 6(8):916-9 (2000)), y en la solicitud de patente internacional nº W003015691A2 titulada "La mejora rápida de la cognición en un sujeto que tiene enfermedad de Alzheimer", síndrome de Down, angiopatía amiloide cerebral o alteración cognitiva leve, comprende administrar el anticuerpo anti-A beta". Otra descripción de fragmentos de anticuerpo para usar en la presente

divulgación se puede encontrar en, por ejemplo, Bales y col. (Abstract P4-396, página S587, presentado en el Póster, Sesión P4: Therapeutics and Therapeutic Strategies-Therapeutic Strategies, Amyloid-Based) y Zameer y co.. (Abstract P4-420, página S593, presentado en el Póster, Sesión P4: Therapeutics and Therapeutic Strategies-Therapeutic Strategies, Amyloid-Based).

5 Los anticuerpos para usar en la presente invención pueden producirse de forma recombinante o sintética. Por ejemplo, el anticuerpo se puede producir mediante un proceso de cultivo celular recombinante usando, por ejemplo, células CHO, células NIH 3T3, células PER.C6@, células NS0, células VERO, fibroblastos de embrión de pollo o células BHK. Además, la presente invención contempla los anticuerpos con modificaciones minoritarias que conservan la propiedad funcional de la unión del péptido A β . El anticuerpo es un anticuerpo 3D6 humanizado anti-A β que se une de forma selectiva al péptido A β . Más específicamente el anticuerpo 3D6 humanizado anti-A β está diseñado para unirse específicamente a un epítipo en NH₂-terminal, por ejemplo los restos de aminoácidos 1-5, localizados en el péptido β -amiloides humano 1-40 o 1-42 encontrado en los depósitos de placas en el cerebro (por ejemplo, en pacientes que sufren enfermedad de Alzheimer).

15 La Figura 1 proporciona una representación esquemática de la estructura predicha de un anticuerpo anti-péptido A β humanizado de ejemplo. Las secuencias de aminoácidos completas de las cadenas ligera y pesada h3D6v2 predichas a partir de las secuencias de ADN de los correspondientes vectores de expresión se muestran en la Figura 2 (en la que los restos se enumeran comenzando con el extremo NH₂ de las cadenas ligera y pesada como número de resto 1) y en la SEC ID N^o 1 y la SEC ID N^o 2, respectivamente. El último resto de aminoácido codificado por la secuencia de ADN de la cadena pesada, Lys449, no se ha observado en la forma madura secretada de h3D6v2 y, sin desear quedar vinculado a ninguna teoría en concreto, se elimina probablemente durante el procesamiento intracelular mediante las proteasas celulares de CHO. Por tanto, el extremo COOH de la cadena pesada h3D6v2 es, opcionalmente, Gly448. Se ha observado procesamiento de lisina en el extremo COOH en los anticuerpos recombinantes y derivados de plasma y no parece afectar a su función (Harris (1995) J. Chromatogr. A. 705:129-134). h3D6v2 purificado se modifica postraduccionalmente mediante la adición de glicanos unidos a N en la porción Fc de la cadena pesada, que se sabe que contiene un sitio consenso sencillo para N-glicosilación. El sitio para N-glicosilación muestra tres estructuras oligosacáridas neutras biantenares complejas que normalmente se observan en el sitio para N-glicosilación análogo de las proteínas IgG de mamífero.

Otro anticuerpo anti péptido A β humanizado de ejemplo es el 3D6 humanizado, versión 1 (hu3D6v1) que tiene la secuencia indicada en la Figura 2, pero para una sustitución D \rightarrow Y en la posición 1 de la cadena ligera.

30 El anticuerpo anti A β (un anticuerpo anti péptido A β 3D6 humanizado) está presente en de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 75 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 40 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml, de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, de aproximadamente 20 mg/ml a 30 mg/ml, o mayor, por ejemplo hasta aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 500 mg/ml, o aproximadamente 1000 mg/ml o más. Preferentemente, el anticuerpo anti A β puede estar presente en una concentración de aproximadamente 17 mg/ml a aproximadamente 23 mg/ml. El anticuerpo anti A β está presente en de aproximadamente 1, 2, 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 30 mg/ml. El anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo 3D6 humanizado anti-A β) está presente en de aproximadamente 17 mg/ml. El anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo 3D6 humanizado anti-A β) está presente en de aproximadamente 20 mg/ml. En otra realización concreta, el anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo 3D6 humanizado anti-A β) está presente en de aproximadamente 30 mg/ml.

Excipientes

45 La presente divulgación proporciona una formulación que puede incluir varios excipientes incluidos, entre otros, tampones, antioxidantes, un agente de tonicidad y un estabilizante. Además, las formulaciones pueden contener un agente adicional para ajustar el pH (por ejemplo, HCl) y un diluyente (por ejemplo, agua). Para ajustar el pH se pueden usar diferentes formas de histidina. En parte, los excipientes sirven para mantener la estabilidad y la actividad biológica del anticuerpo (por ejemplo manteniendo la conformación adecuada de la proteína) y/o para mantener el pH.

Agente tampón

50 La formulación incluye un agente tampón (tampón). El tampón sirve para mantener un pH fisiológicamente adecuado. Además, el tampón puede servir para potenciar la isotonicidad y la estabilidad química de la formulación. En general, la formulación debería tener un pH fisiológicamente adecuado. La formulación tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, preferentemente de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,5. En una realización concreta, la formulación tiene un pH de aproximadamente 6. También se describen intervalos intermedios a los niveles de pH citados anteriormente, por ejemplo, de aproximadamente 5,2 a aproximadamente 6,3, preferentemente 6,0 o 6,2). Por ejemplo, se describen intervalos de valores que usan una combinación de cualquiera de los valores citados anteriormente como límites superiores y/o inferiores. El pH se puede ajustar según sea necesario mediante técnicas conocidas en la técnica.

Por ejemplo, se puede añadir HCl según sea necesario para ajustar el pH hasta niveles deseados o se pueden usar formas diferentes de histidina para ajustar el pH hasta niveles deseados.

5 El tampón puede incluir, entre otros, succinato (sódico o fosfato), histidina, fosfato (sódico o potásico), Tris (tris(hidroximetil)aminometano), dietanolamina, citrato u otros ácidos orgánicos y mezclas de los mismos. El tampón es histidina (por ejemplo, L-histidina). El tampón puede ser succinato. La formulación incluye un aminoácido tal como histidina que está presente en una cantidad suficiente para mantener la formulación a un pH fisiológicamente adecuado. La histidina es un aminoácido de ejemplo que tiene capacidades tampón en el intervalo de pH fisiológico. La histidina posee capacidades tampón por su grupo imidazol. En una realización de ejemplo, el tampón es L-histidina (base) (por ejemplo, $C_6H_9N_3O_2$, PF: 155,15). En otra realización, el tampón es L-histidina monohidrato (por ejemplo, $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$, PF: 209,63). El tampón es una mezcla de L-histidina (base) y L-histidina monohidrato.

15 La concentración del tampón (por ejemplo, L-histidina o succinato) está presente en de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 25 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, preferentemente 5 mM o 10 mM. En varias realizaciones, el tampón puede estar presente en de aproximadamente 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, o 15 mM. En una realización concreta, el tampón está presente en de aproximadamente 10 mM. También se describen intervalos intermedios de las concentraciones citadas anteriormente, por ejemplo de aproximadamente 12 mM a aproximadamente 17 mM. Por ejemplo, se describen intervalos de valores usando una combinación de cualquiera de los valores citados anteriormente como los límites superior y/o inferior. El tampón está presente en una cantidad suficiente para mantener un pH fisiológicamente adecuado.

Agente de tonicidad

25 La formulación incluye un agente de tonicidad. En parte, el agente de tonicidad contribuye al mantenimiento de la isotonicidad de la formulación y al mantenimiento de los niveles proteicos. En parte, el agente de tonicidad contribuye a conservar el nivel, la razón o la proporción del polipéptido terapéuticamente activo presente en la formulación. Como se usa en el presente documento, el término "tonicidad" se refiere al comportamiento de los componentes biológicos en un ambiente fluido o solución. Las soluciones isotónicas poseen la misma presión osmótica que el plasma sanguíneo y, por tanto, se puede infundir por vía intravenosa en un sujeto sin que modifique la presión osmótica del plasma sanguíneo del sujeto. De hecho, el agente de tonicidad está presente en una cantidad suficiente para hacer que la formulación sea adecuada para infusión intravenosa. A menudo, el agente de tonicidad sirve como agente engrosamiento también. Como tal, el agente puede permitir que la proteína supere varias fuerzas, como las de congelación y cizalladura.

30 El agente de tonicidad puede incluir, entre otros, $CaCl_2$, NaCl, $MgCl_2$, lactosa, sorbitol, sacarosa, manitol, trehalosa, rafinosa, polietilenglicol, hidroxietil almidón, glicina y mezclas de los mismos. El agente de tonicidad es manitol (por ejemplo, D-manitol, por ejemplo $C_6H_{14}O_6$, PF: 182,17).

35 El agente de tonicidad está presente en de aproximadamente 2 % a aproximadamente 6 % o de aproximadamente 3 % a aproximadamente 5 % en p/v. El agente de tonicidad está presente en de aproximadamente 3,5% a aproximadamente 4,5% en p/v. El agente de tonicidad está presente en de aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 60 mg/ml, a aproximadamente 30 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, o en de aproximadamente 35 mg/ml a aproximadamente 45 mg/ml. Preferentemente, el agente de tonicidad está presente en de aproximadamente 4% en p/v o en aproximadamente 40 mg/ml. El agente de tonicidad está presente en de aproximadamente 6% en p/v o en aproximadamente 10% en p/v.

40 También se describen intervalos intermedios de las concentraciones citadas anteriormente, por ejemplo, de aproximadamente 3,2% a aproximadamente 4,3 % en p/v o de aproximadamente 32 a aproximadamente 43 mg/ml. Por ejemplo, se describen intervalos de valores que usan una combinación de cualquiera de los valores citados anteriormente como límites superiores y/o inferiores. El agente de tonicidad debería estar presente en una cantidad suficiente para mantener la isotonicidad de la formulación.

Anti-oxidante

50 La formulación incluye un antioxidante para, en parte, conservar la formulación (por ejemplo impidiendo la oxidación).

55 El antioxidante puede incluir, entre otros, GLA (ácido gamma-linolénico)-ácido lipoico, DHA (ácido docosahexaenoico)-ácido lipoico, GLA-tocoferol, ácido di-GLA-3,3'-tiodipropiónico y, en general, cualquiera de, por ejemplo, GLA, DGLA (ácido dihomo-gamma-linolénico), AA (ácido araquidónico), SA (ácido salicílico), EPA (ácido eicosapentaenoico) o DHA (ácido docosahexaenoico) con cualquier antioxidante natural o sintético con el que pueden estar unidos químicamente. Estos incluyen antioxidantes fenólicos (por ejemplo, eugenol, ácido carnósico, ácido cafeico, BHT (hidroxianisol butilado), ácido gálico, tocoferoles, tocotrienoles y antioxidantes flavenoides (tales como miricetina y fisetina)), polienos (por ejemplo, ácido retinoico), esteroides saturados (por ejemplo, Δ^5 -

avenosterol), compuestos de organoazufre (por ejemplo, alicina), terpenos (por ejemplo, geraniol, ácido abiético) y antioxidantes de aminoácido (por ejemplo, metionina, cisteína, carnosina). El antioxidante puede ser ácido ascórbico. El antioxidante es metionina o un análogo de la misma, por ejemplo selenometionina, ácido hidroximetilbutanoico, etionina o trifluorometionina.

5 El antioxidante (por ejemplo, una metionina tal como L-metionina, por ejemplo $\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$, PF=149,21) está presente en de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM. En varias realizaciones, el antioxidante puede estar presente en de aproximadamente 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, o 15 mM. Preferentemente, el antioxidante está presente en de aproximadamente 10 mM. En otra realización concreta, el antioxidante está presente en de aproximadamente 15 mM. También se describen los intervalos intermedios de las concentraciones citadas anteriormente, por ejemplo de aproximadamente 12 mM a aproximadamente 17 mM. Por ejemplo, se describen intervalos de valores que usan una combinación de cualquiera de los valores citados anteriormente como límites superiores y/o inferiores. El antioxidante debería estar presente en una cantidad suficiente para conservar formulación, en parte, previniendo la oxidación.

Estabilizante

Adicionalmente, la formulación incluye un estabilizante, también conocido como tensioactivo. Los estabilizantes son compuestos químicos específicos que interaccionan y estabilizan moléculas biológicas y/o excipientes farmacéuticos generales en una formulación. Dichos estabilizantes se pueden usar junto con una temperatura de almacenamiento menor. En general, los estabilizantes protegen la proteína de fuerzas inducidas en la interface aire/solución y fuerzas inducidas en la solución/superficie, que, por otro lado, pueden tener como resultado agregación de proteínas.

El estabilizante puede incluir, entre otros, glicerina, polisorbatos tales como polisorbato 80, ácidos dicarboxílicos, ácido oxálico, ácido succínico, ácido adípico, ácido fumárico, ácidos ftálicos y combinaciones de los mismos. El estabilizante es polisorbato 80.

25 En una realización, la concentración del estabilizante (polisorbato 80) es de aproximadamente 0,001 % en p/v a aproximadamente 0,01 % en p/v, de aproximadamente 0,001 % en p/v a aproximadamente 0,009% w/v, o de aproximadamente 0,003% en p/v a aproximadamente 0,007% en p/v. Preferentemente, la concentración del estabilizante es de aproximadamente 0,005% en p/v. En otra realización concreta, el estabilizante está presente en de aproximadamente 0,01 % en p/v. También se describen intervalos intermedios de las concentraciones citadas anteriormente, por ejemplo, de aproximadamente 0,002 % a aproximadamente 0,006 % en p/v. Por ejemplo, se describen intervalos de valores que usan una combinación de cualquiera de los valores citados anteriormente como límites superiores y/o inferiores. El estabilizante deberá estar presente en una cantidad suficiente para estabilizar el polipéptido de unión a A β (por ejemplo, anticuerpo anti A β).

35 Otros vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables tales como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) se pueden incluir en la formulación siempre que no afecten de forma adversa a las características deseadas de la formulación. La formulación carece sustancialmente de conservantes, aunque, en realizaciones alternativas, se pueden añadir conservantes según sea necesario. Por ejemplo, se pueden incluir crioprotectores y lioprotectores, por ejemplo la formulación se deberá liofilizar.

40 En un aspecto, las formulaciones de la presente invención incluyen el polipéptido de unión A β (por ejemplo, anticuerpo anti A β), manitol e histidina. Las formulaciones pueden incluir un antioxidante tal como metionina y/o un estabilizante tal como polisorbato 80. Las formulaciones tienen un pH de aproximadamente 6. En otro aspecto, la formulación incluye un polipéptido de unión a A β (por ejemplo, un anticuerpo anti A β), manitol, histidina y metionina. En otro aspecto, la formulación incluye un polipéptido de unión a A β (por ejemplo, un anticuerpo anti A β), manitol, histidina, metionina y polisorbato. En un aspecto particular, la formulación incluye aproximadamente 20 mg/ml de un polipéptido de unión a A β (por ejemplo, un anticuerpo anti-A β), histidina aproximadamente 10 mM, metionina aproximadamente 10 mM, aproximadamente 4% de manitol y tiene un pH de aproximadamente 6. En otro aspecto, la formulación incluye aproximadamente 20 mg/ml del polipéptido de unión a A β (por ejemplo, anticuerpo anti-A β), histidina 10 mM, metionina 10 mM, 4% en p/v de manitol, 0,005% en p/v de polisorbato 80 y tiene un pH de aproximadamente 6. Una formulación preferida incluye de aproximadamente 17 mg/ml a aproximadamente 23 mg/ml de un anticuerpo 3D6 humanizado, histidina aproximadamente 10 mM, metionina aproximadamente 10 mM, aproximadamente 4% en p/v de manitol, aproximadamente 0,005 % de polisorbato 80 y tiene un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. Otra formulación preferida incluye de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml de un anticuerpo 266 humanizado, histidina o succinato aproximadamente 10 mM, metionina aproximadamente 10 mM, aproximadamente 4% en p/v de manitol o sorbitol y tiene un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. Otra formulación preferida más incluye de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml de un anticuerpo 12A11 humanizado, histidina aproximadamente 5 mM, metionina aproximadamente 10 mM, aproximadamente 4% de manitol o NaCl 150 mM y tiene un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. Otra formulación es estable durante al menos aproximadamente 12 meses a una temperatura superior a la de congelación a aproximadamente 10 °C, tiene un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, e incluye al menos un anticuerpo anti-A β a una concentración de aproximadamente 1

mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml, manitol a una concentración de aproximadamente 4% en p/v o NaCl a una concentración de aproximadamente 150 mM, histidina o succinato de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM y metionina 10 mM. Preferentemente, la formulación también incluye polisorbato a una concentración de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,01 % en p/v.

- 5 Se proporcionan preparaciones concentradas del polipéptido de unión a A β (por ejemplo, anticuerpo anti-A β), a menudo útiles como producto farmacológico de masa. Además, realizaciones de la presente invención son estables a la congelación, liofilización y/o reconstitución. Además, realizaciones de la presente invención son estables durante periodos extendidos de tiempo. Por ejemplo, las formulaciones de la presente invención son estables durante al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 meses. En realizaciones concretas, las formulaciones de la presente invención son estables durante al menos aproximadamente 12 meses, durante al menos aproximadamente 18 meses, durante al menos aproximadamente 24 meses o durante al menos aproximadamente 30 meses.

- 15 De acuerdo con la invención, la formulación se puede almacenar a temperaturas de aproximadamente -80°C a aproximadamente 40°C, de aproximadamente 0°C a aproximadamente 25°C, de aproximadamente 0°C a aproximadamente 15°C, o de aproximadamente 0°C a aproximadamente 10°C, preferentemente de aproximadamente 2°C a aproximadamente 8°C. En varias realizaciones, la formulación se puede almacenar a aproximadamente 0°C, 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C o 10°C. En una realización concreta, la formulación se almacena a aproximadamente 5°C. En general, la formulación es estable y conserva actividad biológica en estos intervalos. También se pretende que los intervalos intermedios de las temperaturas citadas anteriormente, por ejemplo de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 17 °C, formen parte de la presente invención. Por ejemplo, se pretende incluir intervalos de valores que usan una combinación de cualquiera de los valores citados anteriormente como límites superiores y/o inferiores.

- 25 Las formulaciones de la presente invención son adecuadas para administración por diversas técnicas. En ciertas realizaciones, la formulación se administra por vía parenteral, tal como por vía intravenosa o intramuscular. Adicionalmente, se puede dirigir la liberación de la formulación al cerebro (por ejemplo, de modo que el anticuerpo pueda atravesar la barrera hematoencefálica) del líquido cefalorraquídeo. En una realización concreta, la formulación se administra por vía intravenosa.

- 30 Las dosis eficaces de las formulaciones de la presente invención varían en función de muchos factores diferentes, incluidos los medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Normalmente, el paciente es un ser humano, pero también se pueden tratar mamíferos no humanos, incluidos los mamíferos transgénicos. Las dosificaciones de tratamiento deberán titularse para optimizar la seguridad y la eficacia.

- 35 Para la inmunización pasiva con un anticuerpo, las dosificaciones de ejemplo son de aproximadamente 0,0001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, 0,5 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg del peso corporal del huésped. En algunas realizaciones de ejemplo, las dosificaciones pueden ser de aproximadamente 0,5, 0,6, 0,7, 0,75, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,25, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,75, 1,8, 1,9, o 2,0 mg/kg. Otras dosificaciones de ejemplo para la inmunización pasiva son de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg. En algunas realizaciones de ejemplo, las dosificaciones pueden ser de aproximadamente 5, 10, 15 o 20 mg/kg. A los sujetos se les puede administrar dosis diarias, en días alternativos, semanales o de acuerdo con cualquier otro calendario determinado mediante análisis empírico. Un tratamiento de ejemplo abarca la administración en múltiples dosificaciones durante un periodo prolongado, por ejemplo de al menos seis meses. Ejemplos de pautas de tratamiento adicionales abarcan la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada de 3 a 6 semanas. Ejemplos de calendarios de dosificación incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg semanales. En algunos procedimientos, se administran de forma simultánea dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes afinidades de unión, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado entra dentro de los intervalos indicados.

- 50 Normalmente, el anticuerpo se administra varias veces. Los intervalos entre dosificaciones únicas pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles en sangre del anticuerpo frente a un A β en el paciente. En algunos procedimientos, la dosificación se ajusta para alcanzar una concentración del anticuerpo en plasma de 1-1.000 μ g/ml y en algunos procedimientos 25-300 μ g/ml. Como alternativa, el anticuerpo se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían en función de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la semivida más prolongada, seguido de los anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos.

- 60 La dosis y la frecuencia de administración pueden variar en función de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, las formulaciones que contienen los presentes anticuerpos o un cóctel de los mismos se administran a un paciente que todavía no sufre la enfermedad para potenciar la resistencia del paciente. Dicha cantidad se define como una "dosis profiláctica eficaz". En este uso, las cantidades precisas dependen, de nuevo,

del estado de salud del paciente y del nivel general de inmunidad, pero, en general, varían de 0,1 a 25 mg por dosis, especialmente de 0,5 a 2,5 mg por dosis. Una dosis relativamente baja se administra a intervalos relativamente infrecuentes en un periodo de tiempo largo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas.

- 5 En algunas aplicaciones terapéuticas, en ocasiones se requiere una dosis relativamente alta (por ejemplo, de aproximadamente 0,5 o 1 a aproximadamente 200 mg/kg de anticuerpo por dosis (por ejemplo, 0,5, 1, 1,5, 2, 5, 10, 20, 25, 50, o 100 mg/kg), siendo las dosis de 5 a 25 mg/kg más frecuentes) a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o termina y, preferentemente, hasta que el paciente muestra una mejora parcial o completa de los síntomas de enfermedad. Después, al paciente se le puede administrar una pauta profiláctica.

10 Es especialmente ventajoso proporcionar formulaciones de la invención en forma farmacéutica unitaria para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. Las formulaciones de la invención se pueden presentar en cápsulas, ampollas, forma liofilizada o en contenedores de múltiples dosis. El término "contenedor" se refiere a algo, por ejemplo un soporte, receptáculo o vaso, en el que se puede introducir o contener un líquido o un objeto para, por ejemplo, almacenamiento. La forma farmacéutica unitaria puede comprender cualquier formulación descrita en el presente documento, incluidas suspensiones, soluciones o emulsiones del principio activo con agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. La forma farmacéutica farmacéutica unitaria se puede añadir a una bolsa de goteo intravenoso (por ejemplo, una bolsa de goteo de 50 ml, 100 ml, o 250 ml o 500 ml) con un diluyente adecuado, por ejemplo agua apirógena estéril o solución salina, antes de la administración al paciente mediante, por ejemplo, infusión intravenosa. Algunas formas de dosificación farmacéutica unitaria pueden requerir reconstitución con un diluyente adecuado antes de la adición a una bolsa de goteo intravenoso, en particular formas liofilizadas. La forma farmacéutica farmacéutica unitaria es un contenedor que contiene una formulación descrita en el presente documento. Por ejemplo, el contenedor puede ser un vial de tubo de vidrio de tipo 1 de 10 ml. En general, el contenedor deberá mantener la esterilidad y estabilidad de la formulación. Por ejemplo, el vial se puede cerrar con un tapón de suero. Además, el contenedor se diseñará de modo que se puedan extraer aproximadamente 100 mg de la formulación o del principio activo (por ejemplo, para un solo uso). Como alternativa, el contenedor puede ser adecuado para cantidades mayores de formulación o del principio activo, por ejemplo, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 5000 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1000 mg, y de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 40 mg a aproximadamente 250 mg, de aproximadamente 60 mg a aproximadamente 80 mg, de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 120 mg, de aproximadamente 120 mg a aproximadamente 160 mg, o rangos o intervalos de los mismos, por ejemplo de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 200 mg. También se describen los intervalos intermedios de las cantidades citadas anteriormente, por ejemplo de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 195 mg. Por ejemplo, se describen intervalos de valores que usan una combinación de cualquiera de los valores citados anteriormente como límites superiores y/o inferiores. La formulación a menudo se suministra como un líquido en una forma farmacéutica unitaria.

En otro aspecto, se proporciona un kit que incluye una forma farmacéutica unitaria (por ejemplo, un contenedor con una formulación divulgada en el presente documento) e instrucciones de uso. De acuerdo con esto, el contenedor y el kit pueden estar diseñados para proporcionar una formulación suficiente para múltiples usos. Dicho kit puede incluir además diluyentes. El diluyente puede incluir excipientes, por separado o combinados. Por ejemplo, el diluyente puede incluir un modificador de la tonicidad tal como manitol, un agente tampón tal como histidina, un estabilizante tal como polisorbato 80, un antioxidante tal como metionina y/o combinaciones de los mismos. El diluyente puede contener otros excipientes, por ejemplo, lioprotector, según considere necesario el experto en la técnica.

- 45 Realizaciones adicionales de la invención útiles se indican en la sección de esta solicitud titulada "Resumen de la invención".

Esta invención se ilustra además con los ejemplos siguientes, que no deben interpretarse como limitantes.

Ejemplos

50 En general, la práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, tecnología de ADN recombinante, inmunología (especialmente, por ejemplo, tecnología de anticuerpos) y técnicas estándar de preparación de polipéptidos. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989); *Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 510, Paul, S., Humana Pr (1996); *Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169)*, Mc-Cafferty, Ed., Ir1 Pr (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow et al., C.S.H.L. Press, Pub. (1999); y *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel y col., John Wiley & Sons (1992).

Ejemplo I. Clonación y expresión del anticuerpo anti-A-beta humanizado

Un ejemplo de anticuerpo para formulación de acuerdo con los procedimientos de la presente invención es 3D6. El

mAb 3D6 es específico del extremo N de A β y se ha demostrado que participa en la fagocitosis (por ejemplo, induce la fagocitosis) de la placa de amiloide. 3D6 no reconoce la APP secretada ni la APP de longitud completa, pero solo detecta la especie de A β con un ácido aspártico amino-terminal. Por tanto, 3D6 es un anticuerpo específico del final. La línea celular RB96 3D6,32,2,4 productora del anticuerpo 3D6 tiene el número de acceso en la ATCC PTA-5130, habiéndose depositado el 8 de abril de 2003. La clonación, caracterización y humanización del péptido A β murino se describe en la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. nº 20030165496 A1. Brevemente, la humanización del anticuerpo monoclonal anti-péptido A β murino (designado m3D6) se llevó a cabo aislando las secuencias de ADN para las regiones variables de la cadena ligera y de la cadena pesada (VL y VH) de m3D6n mediante reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa (RT-PCR). En base a las secuencias de ADN de VL y VH de m3D6 determinadas, se identificaron las regiones de marco humanas homólogas. Para asegurar que el anticuerpo humanizado conservaba la capacidad para interactuar con el antígeno del péptido A β , los restos de marco de VH y VL murino críticos se conservaron en la secuencia de 3D6 humanizado para conservar la estructura global de las regiones del dominio constante (CDR) en el contexto de las secuencias de la cadena ligera kappa humana y de la cadena pesada de IgG1. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias de VH y VL de 3D6 humanizado identificadas mediante este proceso (incluida la secuencia del péptido señal en 5' y la secuencia corte-donante del intrón en 3') se generaron hibridando los oligonucleótidos de ADN solapantes sintetizados, seguido de reacciones de relleno con la ADN polimerasa. La integridad de cada una de las secuencias de la región variable humanizada se verificó mediante secuenciación de ADN. La Figura 1 representa una representación esquemática de la estructura predicha de un anticuerpo 3D6 anti-A β humanizado denominado h3D6v2. La figura 2 identifica las secuencias de aminoácidos completas de las cadenas ligera y pesada de h3D6v2

El anticuerpo 3D6 humanizado se expresó mediante transfección de una línea celular huésped de ovario de hámster chino (CHO) con expresión de plásmidos que codifican los genes de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo anti-A β . Las células CHO que expresan el anticuerpo se aislaron usando procedimientos de amplificación génica/selección de fármaco en base a metotrexato estándar. Una línea de células de CHO clona que exhibe la productividad deseada y los fenotipos de crecimiento se seleccionaron y usó para establecer una línea celular que expresa el anticuerpo usando un medio definido químicamente sin componentes derivados de humanos o de animales.

Ejemplo II: Fabricación de la sustancia farmacológica del anticuerpo anti-A β humanizado

El proceso de fabricación del polipéptido comenzó con la descongelación de un cultivo inicial de células clonales que expresan de forma estable el anticuerpo anti-A β . Las células se cultivaron usando un medio definido químicamente sin proteínas derivadas de humanos o de animales. Después, los cultivos se expandieron y usaron para inocular un biorreactor de inóculos que, a su vez, se usó para inocular múltiples ciclos en el biorreactor de producción. El biorreactor de producción se operó en modo de alimentación discontinua. Al final del ciclo de producción, la recolección del medio acondicionado se aclaró mediante microfiltración en preparación del procesamiento adicional corriente abajo.

Los procesos de purificación consistieron en etapas cromatográficas estándar, seguidas de filtración. El anticuerpo purificado se concentró mediante ultrafiltración y se diafiltró en formulación de tampón sin polisorbato 80. Opcionalmente, se añade polisorbato 80 (derivado vegetal) a la combinación del producto retenido por ultrafiltración/diafiltración, seguido de filtración por retención bacteriana. La sustancia farmacológica se almacenó congelada a -80 °C y se mantuvo para la posterior fabricación en un producto farmacológico, incluidas las formulaciones líquidas estabilizadas descritas en el presente documento.

Ejemplo III: Preparación de la formulación de anticuerpo y placebo

Se fabricaron dos lotes de producto farmacológico con anticuerpo. Se fabricó un lote inicial mezclando la sustancia farmacológica en una formulación animal y humana sin proteínas que contiene 20 mg de la sustancia activa del anticuerpo anti A β por ml, histidina 10 mM, metionina 10 mM, 4 % de manitol, 0,005 % de polisorbato-80, a pH 6,0. El producto farmacológico se cargó en asepsia en viales, a 100 mg de la sustancia activa del anticuerpo anti-A β /vial. El vial con el producto farmacológico terminado no contenía conservantes y estaba destinado para un solo uso.

Se fabricó un segundo lote de producto mediante un procedimiento similar usando un tampón de formulación sin polisorbato 80.

Ejemplo IV- Análisis de estabilidad de las formulaciones con o sin polisorbato-80

La estabilidad y, en concreto, la integridad fisicoquímica (como la agregación, desamidación, hidrólisis y/o reorganización de los puentes disulfuro) de la formulación se evaluaron mediante los siguientes procedimientos bien conocidos en la técnica. aspecto; pH; concentración de proteínas (A280); ELISA, en parte, como ensayo de bioactividad, electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE), en parte como ensayo de agregación; cromatografía de líquidos de alto rendimiento de exclusión por tamaño (SEC-HPLC), en parte, como ensayo de agregación y estabilidad en general; cromatografía de líquidos de alto rendimiento de intercambio catiónico (CEX-HPLC), en parte, como ensayo de desamidación y estabilidad en general; y mapeo peptídico. Estos procedimientos evaluaron la recuperación e integridad de la proteína en las condiciones de ensayo a varias

temperaturas.

- El análisis del aspecto de las formulaciones se realizó con el fin de determinar la calidad de las formulaciones a varios puntos de tiempo. El análisis se realizó en base a una inspección visual de la claridad, el color y la presencia de partículas. Por ejemplo, el grado de opalescencia se analizó en términos de las suspensiones de referencia. El análisis del aspecto de las formulaciones realizado con y sin polisorbato 80 de acuerdo con la presente invención demostró que ambas formulaciones eran aceptables cuando se almacenaban a cada uno de -80°C, 5°C, 25°C, y 40°C a cada uno de los puntos de tiempo siguientes: inicial, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses y 12 meses.
- El análisis del pH se realizó para determinar el mantenimiento del pH de la formulación en un intervalo aceptable de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. El análisis del pH de las formulaciones realizado con y sin polisorbato 80 de acuerdo con la presente invención demostró que ambas formulaciones eran aceptables cuando se almacenaban a cada uno de -80°C, 5°C, 25°C, y 40°C a cada uno de los puntos de tiempo siguientes: inicial, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses y 12 meses. En general, el pH nunca varió por debajo de 5,8 o por encima de 6,2.
- El análisis de la concentración de proteínas mediante ensayos de A280 se realizó para determinar el mantenimiento de la concentración de proteínas de la formulación dentro de un intervalo aceptable de aproximadamente 17 mg/ml a aproximadamente 23 mg/ml. El análisis de la concentración de proteínas de las formulaciones realizado con y sin polisorbato 80 de acuerdo con la presente invención demostró que ambas formulaciones eran, en general, aceptables cuando se almacenaban a cada uno de -80°C, 5°C, 25°C, y 40°C a cada uno de los puntos de tiempo siguientes: inicial, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses y 12 meses. Con la excepción de las concentraciones de proteínas, que varían ligeramente por encima de 23 mg/ml para la formulación sin polisorbato 80 cuando se almacenaban a 5°C, 25°C y 40°C a los puntos de tiempo de 3 meses, la concentración de proteínas permaneció, de otro modo, dentro de los intervalos aceptables. De acuerdo con esto, el análisis de la concentración de proteínas demostró ausencia de pérdida detectable de proteínas, incluso en condiciones aceleradas, en particular para las formulaciones con polisorbato 80. Además, la concentración de proteínas no pudo, en general, demostrar un tiempo significativo o un cambio dependiente de la temperatura posterior al punto de tiempo inicial.
- El mantenimiento de la actividad biológica se analizó, en parte, mediante técnicas de ELISA. La actividad biológica se analizó como las unidades de unión (UU)/mg con actividad aceptable ≥ 2.500 UU/mg o 50% (es decir, 5.000 UU/mg equivale al 100%). El análisis ELISA de las formulaciones realizado con y sin polisorbato 80 de acuerdo con la presente invención demostró que ambas formulaciones eran, en general, aceptables cuando se almacenaban a cada uno de -80°C, 5°C, 25°C, y 40°C a cada uno de los puntos de tiempo siguientes: inicial, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses y 12 meses. Con la excepción de la actividad biológica, que varía ligeramente por debajo de 50% en el punto de tiempo de 12 meses para ambas formulaciones cuando se almacenan a 40°C, la actividad biológica permaneció, de otro modo, dentro de los intervalos aceptables.
- El análisis por SEC-HPLC se realizó como ensayo de agregación, pureza y estabilidad en general. SEC-HPLC se realiza en condiciones usando cromatografía de fase móvil con un tampón dibásico de fosfato sódico indicó que la formulación era aceptable si el análisis por SEC-HPLC identificaba $\geq 90\%$ de monómero de IgG, en comparación con el porcentaje de producto de alto peso molecular y de producto de bajo peso molecular. El análisis SEC-HPLC de las formulaciones realizado con y sin polisorbato 80 de acuerdo con la presente invención demostró que ambas formulaciones eran, en general, aceptables cuando se almacenaban a cada uno de -80°C, 5°C, 25°C, y 40°C a cada uno de los puntos de tiempo siguientes: inicial, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses y 12 meses. Con la excepción del porcentaje de monómero que varía por debajo del 90 % para ambas formulaciones cuando se almacenan a 40 ° a cada punto de tiempo a los 6 meses y después (donde el análisis identificó más de al menos un 10 % de producto de bajo peso molecular para ambas formulaciones a cada punto de tiempo), el porcentaje de monómero estaba, de otro modo, dentro del intervalo aceptable. El análisis por SEC-HPLC demostró, en general, que aunque los perfiles de alto peso molecular y de bajo peso molecular eran diferentes en el tiempo en las muestras con y sin polisorbato, la forma monomérica del anticuerpo generalmente permaneció constante, por ejemplo al punto de tiempo de 12 meses, cuando la formulación se almacenaba a 5 °C.
- El análisis por CEX-HPLC se realizó como ensayo de afinación y estabilidad en general. La CEX-HPLC se realizó en condiciones de uso de cromatografía en fase móvil con un tampón de NaCl produjo un perfil de elución y tiempos de retención de picos predominantes que se analizaron como comparables o no comparables a los perfiles de referencia estándar. El análisis por CEX-HPLC de las formulaciones realizado con y sin polisorbato 80 de acuerdo con la presente invención demostró que ambas formulaciones eran, en general, aceptables cuando se almacenaban a cada uno de -80°C, 5°C, 25°C, y 40°C a cada uno de los puntos de tiempo siguientes: inicial, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses y 12 meses. Con la excepción del perfil de elución y el tiempo de retención de los picos predominantes no siendo comparables para ambas formulaciones cuando se almacenan a 40 °C a cada punto de tiempo a los 3 meses y después, los picos predominantes eran, de otro modo, comparables a los picos de referencia.

En general, el análisis de las formulaciones con polisorbato 80 almacenadas a 5 °C permiten las siguientes conclusiones particularmente importantes: 1) los análisis de opalescencia, pH, ELISA, CEX-HPLC, SEC-HPLC y SDS PAGE mostraron todos ellos cambios mínimos en la formulación en más de 9 meses; 2) las formulaciones almacenadas a 5°C parecían más como las muestras de referencia a los 9 meses que las muestras aceleradas; 3) el mapeo del péptido mostró cambios a 5 °C; y 4) los datos de tendencia en la SEC-HPLC a 5°C predijeron al menos 17,2 meses de estabilidad (véase la Figura 6), no obstante, tras eliminar la columna, la variabilidad del instrumento y del tampón, los datos permitieron una predicción de más de 30 meses de estabilidad (Véase la Figura 7). Adicionalmente, las muestras aceleradas con polisorbato 80 almacenadas a 25 °C pasaron todas las especificaciones a los 9 meses (Figura 4).

Además, el análisis de las formulaciones sin polisorbato 80 almacenadas a 5 °C permiten las siguientes conclusiones particularmente importantes: 1) los análisis de opalescencia, pH y ELISA mostraron todos ellos cambios mínimos en la formulación en más de 9 meses; 2) los resultados de CEX-HPLC y SDS PAGE mostraron hallazgos comparables a las muestras de referencia o a los controles a -80 °C a los 9 meses; 3) el análisis SEC-HPLC mostró cambios mínimos en 9 meses, mientras que los cambios eran más pronunciados a temperaturas aceleradas; y 4) los datos de tendencia en la SEC-HPLC predijeron al menos 18 meses de estabilidad incluso con problemas de variabilidad del ensayo (Véase la Figura 8).

Las Figuras 3-5 son representaciones gráficas de las predicciones de la vida de almacenamiento para las formulaciones (con y sin PS80) preparadas de acuerdo con la presente invención y almacenadas a 5°C, 25°C, y 40°C, respectivamente. En general, las Figuras 3-5 indican que el almacenamiento de las formulaciones de la presente invención a temperaturas más altas reduce la vida de almacenamiento prevista. La Figura 3, en concreto, indica que la formulación tiene una vida de almacenamiento prevista de al menos 18 meses cuando la formulación se almacena a 5 °C. La Figura 4 indica que el almacenamiento de la formulación a temperatura ambiente (25 °C) puede servir para reducir la vida de almacenamiento prevista a aproximadamente 12 meses. La Figura 5 demuestra que el almacenamiento de la formulación a 40 °C puede servir para reducir la vida de almacenamiento prevista a aproximadamente 4 meses.

Ejemplo de referencia V. Estudios de estabilidad con el uso de metionina como antioxidante

Se realizaron estudios para determinar el efecto de la metionina en el mantenimiento de la estabilidad del anticuerpo en formulaciones de anticuerpo. El análisis por SEC-HPLC se realizó en 6 meses a varias temperaturas en cuatro muestras de anticuerpo (usando un anticuerpo IgG4 anti-CD22): una formulación de anticuerpo con succinato 20 mM a pH 6,0; una formulación de anticuerpo con succinato 20 mM y metionina 10 Mm; formulación de anticuerpo con succinato 20 mM y 0,01 % de PS80; y formulación de anticuerpo con succinato 20 mM, metionina 10 Mm y 0,01 % de PS80. En general, los resultados indicaron que la metionina reduce, deseablemente, la formación de peso molecular alto (PMA). Además, la metionina disminuye el incremento dependiente de la temperatura del porcentaje de PMA (véase la Figura 10).

Además, se realizó un estudio de estabilidad del pH (a pH 5,8, 6,0 y 6,2) en 6 semanas a varias temperaturas (5 °C y 40 °C) en las siguientes cuatro muestras de anticuerpo (un anticuerpo IgG2 anti-B7). (1) una muestra que incluye un anticuerpo, histidina 10 mM y NaCl 150 mM; (2) una muestra que incluye un anticuerpo, histidina 10 mM y NaCl 150 mM y 0,01 % de PS80; (3) una muestra que incluye un anticuerpo, histidina 10 mM y NaCl 150 mM y metionina 10 mM; y (4) una muestra que incluye un anticuerpo, histidina 10 mM, NaCl 150 mM, metionina 10 mM y 0,01% de PS80, se realizó un análisis SEC-HPLC. Los resultados demostraron que la metionina disminuye el incremento dependiente de temperatura en porcentaje de formación de subproducto (por ejemplo, subproductos de PMA) sobre el intervalo de pH indicado, por ejemplo un pH de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,2 (véase la Figura 11). Como se muestra en la Figura 11, las muestras que contenían metionina mostraron una cantidad baja de agregación cuando se mantuvieron a 40 °C durante seis semanas, que fue similar a la de las muestras mantenidas a 5 °C durante seis semanas.

Ejemplo VI. Análisis del excipiente de un anticuerpo IgG1 mediante calorimetría de barrido diferencial

Un objetivo principal de la formulación del fármaco proteico es estabilizar una proteína en su forma nativa biológicamente activa. Normalmente esto se puede realizar mediante detección selectiva de varios excipientes en una formulación base y siguiendo su efecto sobre el peso molecular y la actividad de la molécula. Estos parámetros son indicativos de estabilidad. Otra medición de estabilidad es la desnaturalización térmica, que se puede seguir usando diversas técnicas biofísicas. En general, los mayores niveles de estabilidad proteica se han atribuido a temperaturas de fusión, desnaturalización o descomposición altas. De acuerdo con esto, las propiedades térmicas de un anticuerpo monoclonal IgG1 representativo se siguieron en presencia de varios excipientes usando una calorimetría de barrido diferencial capilar-VP. Específicamente, las T_f aparentes se determinaron para las formulaciones que contienen histidina 10 mM (pH 6,0) con varios excipientes. Se demostró que varios excipientes proporcionaban mayor o menor estabilidad térmica. Dado que los mayores niveles de estabilidad proteica se han atribuido a una temperatura de fusión alta, los excipientes de las muestras que imparten T_{m2} o T_{m3} , mayores, en comparación con los valores de T_{m2} / T_{m3} control (respectivamente, 74,9°C and 83,4°C), se estimaron que eran excipientes especialmente deseables (Véase la Tabla 1 a continuación).

De acuerdo con esto, se concluyó que los excipientes tales como glucosa (formulada a una concentración del 4 % y del 10 %), sacarosa (formulada a una concentración del 4 % y del 10 %), sorbitol (formulada a una concentración del 4 % y del 10 %) y manitol (formulada a una concentración del 4 % y del 10 %), funcionaron especialmente bien en la estabilización de una formulación polipeptídica líquida, en particular una formulación de anticuerpo IgG.

5

Tabla 1. Resultados del análisis de excipientes

Excipiente	Concentración	T _{m1} *	T _{m2} *	T _{m3} *
Histidina (control)	10 mM	-	74,9	83,4
NaCl	10 mM	69,3	74,8	82,9
	100 mM	67,9	74,4	82,4
	500 mM	66,5	74,5	81,9
	1M	65,4	74,9	82,3
CaCl₂	10mM	68,7	74,6	82,7
	100 mM	68,5	74,5	82,4
Metionina	30 mM	-	74,5	83,7
Vitamina C	~ 30 mM	52,2	68,7	-
Polisorbato 20	0,005%	-	74,5	83,7
	0,01%	-	74,5	83,8
	0,10%	-	74,4	83,7
Polisorbato 80	0,005%	-	74,6	83,8
	0,01%	-	74,5	83,7
	0,10%	-	74,5	83,7
Glucosa	0,50%	-	74,7	83,8
	2%	-	74,9	83,9
	4%	-	75	84,3
	10%	-	75,8	84,9
Sacarosa	0,50%	-	74,6	83,6
	2%	-	74,8	83,8
	4%	-	75	83,9
	10%	-	75,5	84,4
Sorbitol	0,50%	-	74,8	83,6
	2%	-	75	83,8
	4%	-	75,2	84,1
	10%	-	75,9	84,8
Manitol	0,50%	-	74,8	83,6
	2%	-	74,9	83,8

(continuación)

Excipiente	Concentración	T _{m1} *	T _{m2} *	T _{m3} *
	4%	-	75,2	84,1
	10%	-	75,9	84,8

*En el control (histidina 10 mM, pH 6,0) se observaron dos transiciones, T_{m2} y T_{m3}. En presencia de algunos excipientes se observó una transición anterior (T_{m1}).

Listado de secuencias

- 5 <110> NEURALAB LIMITED
WYETH
- <120> FORMULACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-A-BETA
- <130> P047546EP
- <140> EP 06719621.2
- <141> 27-01-2006
- 10 <150> US 60/648.631
- <151> 28-01-2005
- <160> 47
- <170> PatentIn versión 3.3
- 15 <210> 1
- <211> 219
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Construcción sintética
- 20 <400> 1

ES 2 391 407 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 2

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

ES 2 391 407 T3

<400> 2

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Asn Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

ES 2 391 407 T3

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

ES 2 391 407 T3

405

410

415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

- <210> 3
- <211> 113
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Anticuerpo humanizado sintético
- <220>
- <221> VARIANTE
- 10 <222> 1
- <223> Xaa = Asp o Tyr
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> 7
- 15 <223> Xaa = Ser o Thr
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> 10
- <223> Xaa = Ser o Thr
- 20 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> 15
- <223> Xaa = Leu, Ile o Val
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> 50
- <223> Xaa = Arg o Lys
- <220>
- <221> VARIANTE
- 30 <222> 88
- <223> Xaa = Val o Leu
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> 109
- 35 <223> Xaa = Val o Leu
- <400> 3

ES 2 391 407 T3

Xaa Val Val Met Thr Gln Xaa Pro Leu Xaa Leu Pro Val Thr Xaa Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Xaa Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Xaa Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Xaa Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

- <210> 4
- <211> 119
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Anticuerpo humanizado sintético
- <220>
- <221> VARIANTE
- 10 <222> 3
- <223> Xaa = Gln, Lys o Arg
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> 78
- 15 <223> Xaa = Ser o Thr
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> 87
- <223> Xaa = Arg o Lys
- 20 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> 88
- <223> Xaa = Ala, Ser o Thr
- <220>
- 25 <221> VARIANTE
- <222> 114
- <223> Xaa = Leu, Thr, Ile o Val
- <400> 4

ES 2 391 407 T3

Glu Val Xaa Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Asn Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Xaa Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Xaa Xaa Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 5

ES 2 391 407 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 6

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 6

ES 2 391 407 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Asn Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 7

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

ES 2 391 407 T3

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 8

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Asn Val
50 55 60

ES 2 391 407 T3

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

ES 2 391 407 T3

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

- <210> 9
- <211> 113
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Anticuerpo humanizado sintético
- <220>
- <221> VARIANTE
- 10 <222> 3
- <223> Xaa = Val o Leu
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> 7
- 15 <223> Xaa = Ser o Thr
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> 14
- <223> Xaa = Thr o Ser
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> 17
- <223> Xaa = Gln, Asp o Asn
- <220>
- 25 <221> VARIANTE
- <222> 30

ES 2 391 407 T3

<223> Xaa = Ile o Val

<220>

<221> VARIANTE

<222> 50

5 <223> Xaa = Arg o Lys

<220>

<221> VARIANTE

<222> 88

<223> Xaa = Val o Leu

10 <220>

<221> VARIANTE

<222> 105

<223> Xaa = Gly o Ala

15 <220>

<221> VARIANTE

<222> 109

<223> Xaa = Val o Leu

<400> 9

Asp Val Xaa Met Thr Gln Xaa Pro Leu Ser Leu Pro Val Xaa Leu Gly
1 5 10 15

Xaa Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Xaa His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Xaa Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Xaa Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Xaa Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

20 <210> 10

<211> 123

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Anticuerpo humanizado sintético

<220>

<221> VARIANTE

<222> 1

<223> Xaa = Gln o Glu

- <220>
<221> VARIANTE
<222> 2
<223> Xaa = Val o Ala
- 5 <220>
<221> VARIANTE
<222> 64
<223> Xaa = Ser o Thr
- 10 <220>
<221> VARIANTE
<222> 77
<223> Xaa = Lys o Arg
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> 78
<223> Xaa = Ser o Thr
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> 83
<223> Xaa = Thr o Ser
- 25 <220>
<221> VARIANTE
<222> 84
<223> Xaa = Met, Ile o Leu
- 30 <220>
<221> VARIANTE
<222> 86
<223> Xaa = Asn, Ser o Thr
- 35 <220>
<221> VARIANTE
<222> 87
<223> Xaa = Met, Val o Leu
- 35 <220>
<221> VARIANTE
<222> 118
<223> Xaa = Leu o Ser
- <400> 10

ES 2 391 407 T3

Xaa Xaa Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Xaa
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Xaa Xaa Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Val Arg Arg Pro Ile Thr Pro Val Leu Val Asp Ala Met Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 11

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 11

ES 2 391 407 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Ile His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 12

<211> 123

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 12

ES 2 391 407 T3

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Val Arg Arg Pro Ile Thr Pro Val Leu Val Asp Ala Met Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gln Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 13

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 13

ES 2 391 407 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Ile His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Gly Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Tyr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 14

<211> 453

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 14

ES 2 391 407 T3

Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

ES 2 391 407 T3

Cys Val Arg Arg Pro Ile Thr Pro Val Leu Val Asp Ala Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln

ES 2 391 407 T3

	355		360		365												
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala		
	370					375					380						
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Gln	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Tyr		
385					390					395					400		
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu		
				405					410					415			
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser		
			420					425					430				
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser		
		435					440					445					
Leu	Ser	Pro	Gly	Lys													
	450																

- <210> 15
- <211> 132
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Anticuerpo humanizado sintético
- <220>
- 10 <221> SEÑAL
- <222> 1 – 20
- <223>
- <220>
- 15 <221> CADENA
- <222> 21 – 132
- <223>
- <400> 15

ES 2 391 407 T3

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
 -20 -15 -10 -5

Gly Ser Ser Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
 -1 1 5 10

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn
 15 20 25

Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys
 30 35 40

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 45 50 55 60

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 65 70 75

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 80 85 90

Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 95 100 105

Leu Glu Ile Lys
 110

- <210> 16
- <211> 142
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Anticuerpo humanizado sintético
- <220>
- 10 <221> SEÑAL
- <222> 1 - 19
- <223>
- <220>
- <221> CADENA
- 15 <222> 20 - 142
- <223>
- <400> 16

ES 2 391 407 T3

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 -15 -10 -5

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 -1 1 5 10

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 15 20 25

Ser Thr Asn Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 30 35 40 45

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Glu Asp Lys Arg Tyr
 50 55 60

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
 65 70 75

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 80 85 90

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ile Tyr Asp Val Glu Asp Tyr
 95 100 105

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120

<210> 17
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<220>
 <221> SEÑAL
 <222> 1 - 19
 <223>

10

<220>
 <221> CADENA
 <222> 20 - 131
 <223>

<400> 17

ES 2 391 407 T3

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 -15 -10 -5

Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 -1 1 5 10

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile
 15 20 25

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 30 35 40 45

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 65 70 75

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 80 85 90

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
 95 100 105

Glu Leu Lys
 110

- <210> 18
- <211> 142
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Anticuerpo humanizado sintético
- <220>
- 10 <221> SEÑAL
- <222> 1 - 19
- <223>
- <220>
- <221> CADENA
- 15 <222> 20 - 142
- <223>
- <400> 18

ES 2 391 407 T3

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 -15 -10 -5

Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 -1 1 5 10

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 15 20 25

Ser Thr Asn Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 30 35 40 45

Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Tyr Trp Asp Glu Asp Lys Arg Tyr
 50 55 60

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
 65 70 75

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 80 85 90

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ile Tyr Asp Val Glu Asp Tyr
 95 100 105

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120

<210> 19
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Anticuerpo humanizado sintético

<220>
 <221> SEÑAL
 <222> 1 - 19
 <223>

10

<220>
 <221> CADENA
 <222> 20 - 142
 <223>

15

<400> 19

ES 2 391 407 T3

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 -15 -10 -5

Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 -1 1 5 10

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 15 20 25

Ser Thr Asn Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 30 35 40 45

Gly Leu Glu Trp Leu Gly His Ile Tyr Trp Asp Glu Asp Lys Arg Tyr
 50 55 60

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
 65 70 75

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 80 85 90

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ile Tyr Asp Val Glu Asp Tyr
 95 100 105

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120

<210> 20

<211> 112

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 20

ES 2 391 407 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser

85

90

95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 21

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 21

ES 2 391 407 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 22

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 22

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu

ES 2 391 407 T3

35 40 45

Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 23

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 23

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

10 <210> 24

ES 2 391 407 T3

<211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 24

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 25
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 25

ES 2 391 407 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 26

<211> 120

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 26

ES 2 391 407 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 27

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 27

ES 2 391 407 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 28

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 28

ES 2 391 407 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 29

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 29

ES 2 391 407 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 30

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
20 25 30

ES 2 391 407 T3

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- <210> 31
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 31
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

ES 2 391 407 T3

<210> 32
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 32

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Val
 115 120

10 <210> 33
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Anticuerpo humanizado sintético

15 <400> 33

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

ES 2 391 407 T3

Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Val
115 120

<210> 34
<211> 120
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo humanizado sintético
<400> 34

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

10 <210> 35
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Anticuerpo humanizado sintético
<400> 35

ES 2 391 407 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 36

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 36

ES 2 391 407 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 37

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 37

ES 2 391 407 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 38

<211> 120

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 38

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu

ES 2 391 407 T3

	35		40		45														
Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser				
	50					55						60							
Leu	Lys	Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu				
	65				70					75					80				
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr				
				85					90					95					
Cys	Ala	Arg	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Asp	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln				
			100					105					110						
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser												
			115				120												

<210> 39

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 39

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg				
1				5					10					15					
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser				
			20					25					30						
Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu				
		35					40					45							
Trp	Val	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser				
	50					55						60							
Leu	Lys	Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu				
	65				70					75					80				
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr				
				85					90					95					
Cys	Ala	Arg	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Asp	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln				
			100					105					110						
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser												
			115				120												

10 <210> 40

ES 2 391 407 T3

<211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 40

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 41
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 41

ES 2 391 407 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- 5 <210> 42
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Anticuerpo humanizado sintético
- 10 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> 2
- <223> Xaa = Val o Ile
- 15 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> 7
- <223> Xaa = Ser o Thr
- 20 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> 14
- <223> Xaa = Thr o Ser
- 25 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> 30
- <223> Xaa = Ile o Val
- <220>
- <221> VARIANTE

ES 2 391 407 T3

<222> 50
 <223> Xaa = Arg, Gln, o Lys

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 88
 <223> Xaa = Val o Leu

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 105
 <223> Xaa = Gln o Gly

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 108
 <223> Xaa = Lys o Arg

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 109
 <223> Xaa = Val o Leu

<400> 42

Asp	Xaa	Val	Met	Thr	Gln	Xaa	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Xaa	Xaa	Gly
1				5					10					15	
Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Xaa	Tyr	Ser
			20					25					30		
Asp	Gly	Asn	Ala	Tyr	Leu	His	Trp	Phe	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Xaa	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75					80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Xaa	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Ser
				85					90					95	
Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Xaa	Gly	Thr	Xaa	Xaa	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

20 Arg

<210> 43
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Anticuerpo humanizado sintético
 <220>
 <221> VARIANTE

30 <222> 1
 <223> Xaa = Glu o Gln

ES 2 391 407 T3

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7
 <223> Xaa = Ser o Leu

5

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 46
 <223> Xaa = Glu, Val, Asp o Ser

10

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 63
 <223> Xaa = Thr o Ser

15

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 75
 <223> Xaa = Ala, Ser, Val o Thr

20

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 76
 <223> Xaa = Lys o Arg

25

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 107
 <223> Xaa = Leu o Thr

<400> 43

Xaa	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Xaa	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Arg	Tyr
			20					25					30		
Ser	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Xaa	Leu	Val
		35					40					45			
Ala	Gln	Ile	Asn	Ser	Val	Gly	Asn	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Xaa	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Xaa	Xaa	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Xaa	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Ser	Gly	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Xaa	Val	Thr	Val	Ser	Ser
			100					105					110		

30

<210> 44
 <211> 113

ES 2 391 407 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

5 <400> 44

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Thr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 45

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 45

10

ES 2 391 407 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

5

<210> 46

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 46

ES 2 391 407 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser
 20 25 30

Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 47

<211> 442

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado sintético

<400> 47

ES 2 391 407 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 130 135 140
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 180 185 190
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 195 200 205
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 210 215 220
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

ES 2 391 407 T3

225						230						235				240
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
				245					250					255		
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
			260					265					270			
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
		275					280					285				
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
	290					295					300					
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
305					310					315					320	
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
				325					330					335		
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	
			340					345					350			
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
		355					360					365				
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
	370					375					380					
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
385					390					395					400	
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
				405					410					415		
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	
			420					425					430			
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
		435					440									

REIVINDICACIONES

1. Una formulación estable que comprende:
 - 5 (a) un anticuerpo monoclonal anti-A β humanizado a una concentración de 17 mg/ml a 23 mg/ml, comprendiendo el anticuerpo humanizado una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N $^{\circ}$ 1 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 1-448 de la SEC ID N $^{\circ}$ 2;
 - (b) histidina a una concentración de 5 mM a 15 mM;
 - (c) manitol en una cantidad de 2 % en p/v a 6% en p/v;
 - 10 (b) metionina a una concentración de 5 mM a 15 mM; y
 - (e) polisorbato en una cantidad de 0,001 % en p/v a 0,1 % en p/v; teniendo la formulación un pH de 5,5 a 6,5.
2. La formulación de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo está presente en una concentración de 20 mg/ml.
3. La formulación de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la histidina está presente en una concentración de 10 mM.
- 15 4. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el manitol está presente en una cantidad del 4 % en p/v.
5. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la metionina está presente a una concentración de 10 mM.
- 20 6. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el polisorbato está presente en una cantidad del 0,005% en p/v.
7. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el pH es 6,0.
8. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la histidina es L-histidina, el manitol es D-manitol, la metionina es L-metionina y el polisorbato es polisorbato 80.
- 25 9. Una forma farmacéutica unitaria que comprende una formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende de 10 mg a 250 mg del anticuerpo monoclonal anti-A β humanizado.
10. La forma farmacéutica unitaria de la reivindicación 9, que comprende de 40 mg a 200 mg del anticuerpo monoclonal anti-A β humanizado.
11. La forma farmacéutica unitaria de la reivindicación 10, que comprende de 60 mg a 160 mg del anticuerpo monoclonal anti-A β humanizado.
- 30 12. La forma farmacéutica unitaria de la reivindicación 11, que comprende de 80 mg a 120 mg del anticuerpo monoclonal anti-A β humanizado.
13. La forma farmacéutica unitaria de la reivindicación 12, que comprende 100 mg del anticuerpo monoclonal anti-A β humanizado.
14. Un producto terapéutico, que comprende:
 - 35 (i) un vial de vidrio que contiene una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende de 10 mg a 250 mg del anticuerpo monoclonal anti-A β humanizado.
 - (ii) etiquetado para el uso que incluye instrucciones de uso del volumen adecuado de la formulación para alcanzar una dosis de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg en un paciente.
- 40 15. El producto terapéutico de la reivindicación 14, que comprende de 40 mg a 200 mg del anticuerpo monoclonal anti-A β humanizado.
16. El producto terapéutico de la reivindicación 15, que comprende de 60 mg a 160 mg del anticuerpo monoclonal anti-A β humanizado.
17. El producto terapéutico de la reivindicación 16, que comprende de 80 mg a 120 mg del anticuerpo monoclonal anti-A β humanizado.
- 45 18. El producto terapéutico de la reivindicación 17, que comprende 100 mg del anticuerpo monoclonal anti-A β humanizado.
19. El producto terapéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, en el que la dosis es de 0,01 mg/kg a 5 mg/kg.

20. El producto terapéutico de la reivindicación 19, en el que la dosis es de 1 mg/kg a 2 mg/kg.
21. El producto terapéutico de la reivindicación 14, en el que la dosis es de 5 mg/kg.
22. El producto terapéutico de la reivindicación 14, en el que la dosis es de 10 mg/kg.
- 5 23. El producto terapéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 22, en el que el uso es una administración subcutánea.
24. El producto terapéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 22, en el que el uso es una administración intravenosa.
- 10 25. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, la forma farmacéutica unitaria de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13 o el producto terapéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 24 para usar en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad caracterizada por depósitos de A β .
26. La formulación, forma farmacéutica unitaria o producto terapéutico de la reivindicación 25, en los que la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.
27. Uso de una formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en la fabricación de un medicamento para usar en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad que se caracteriza por depósitos de A β .
- 15 28. El uso de acuerdo con la reivindicación 27, en el que la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.

FIG. 1

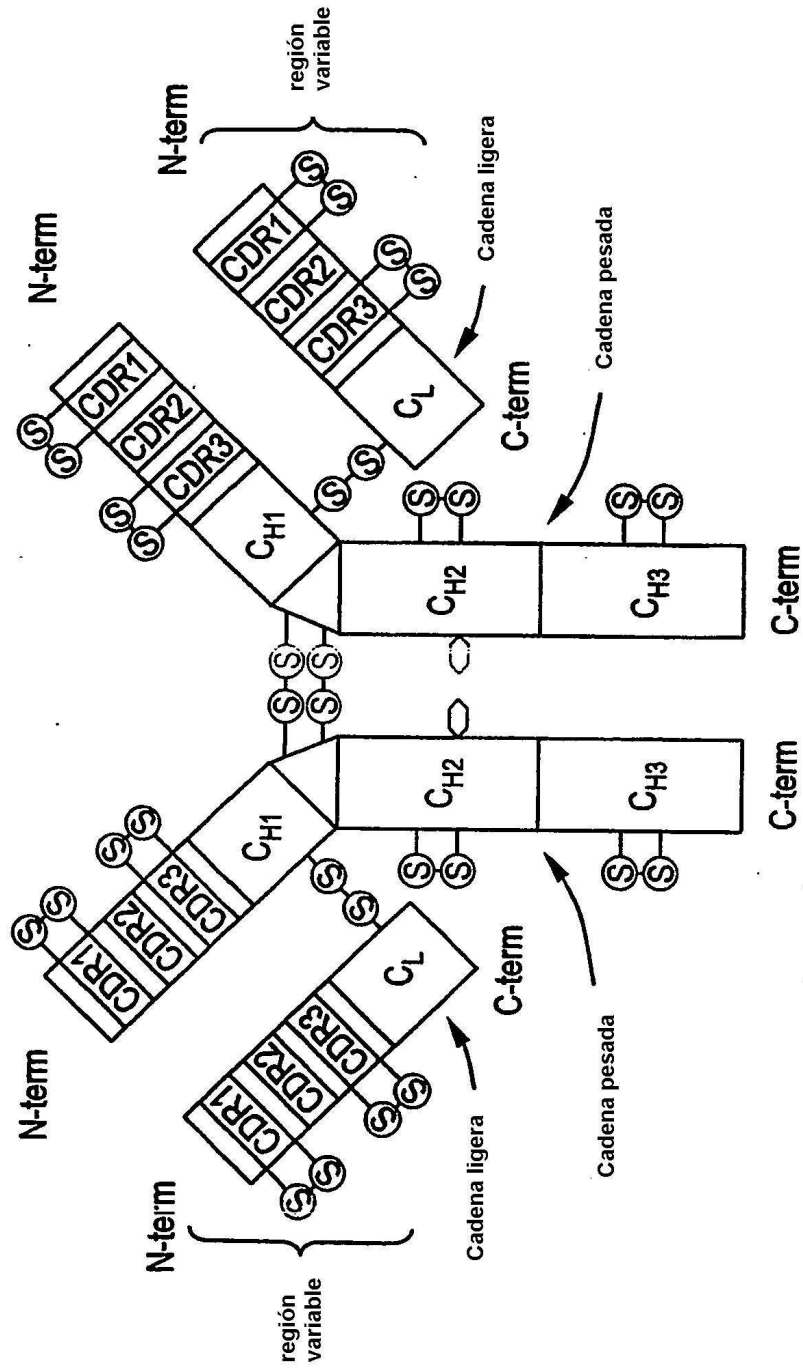


FIG. 2

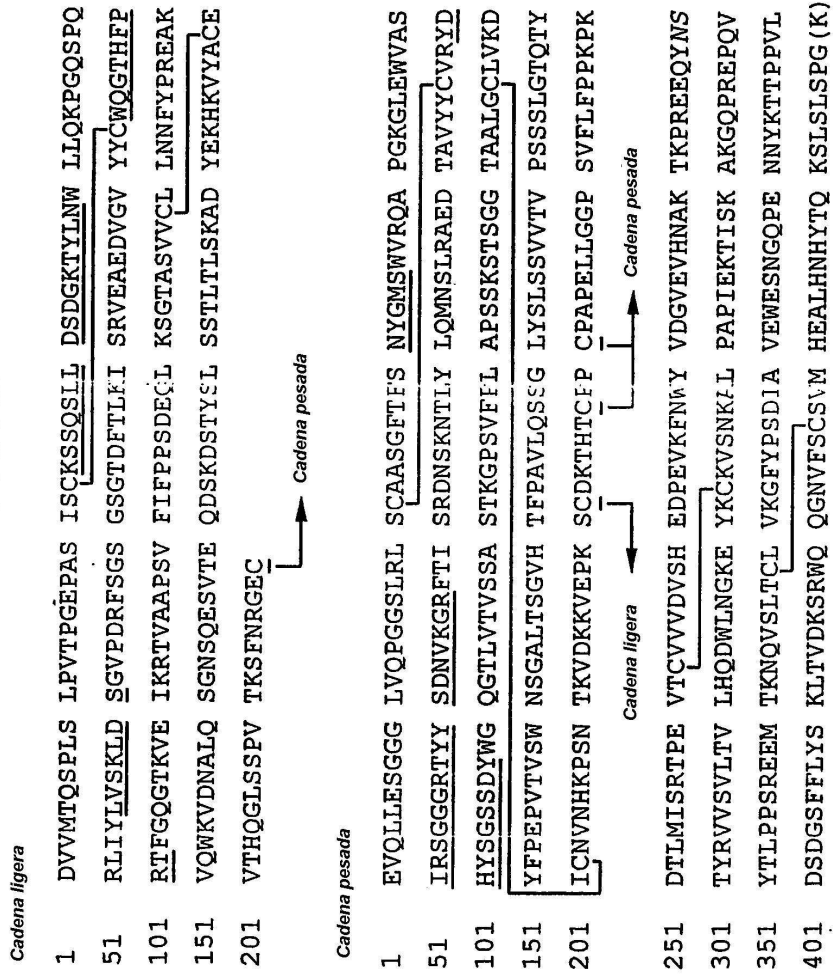


FIG. 3B

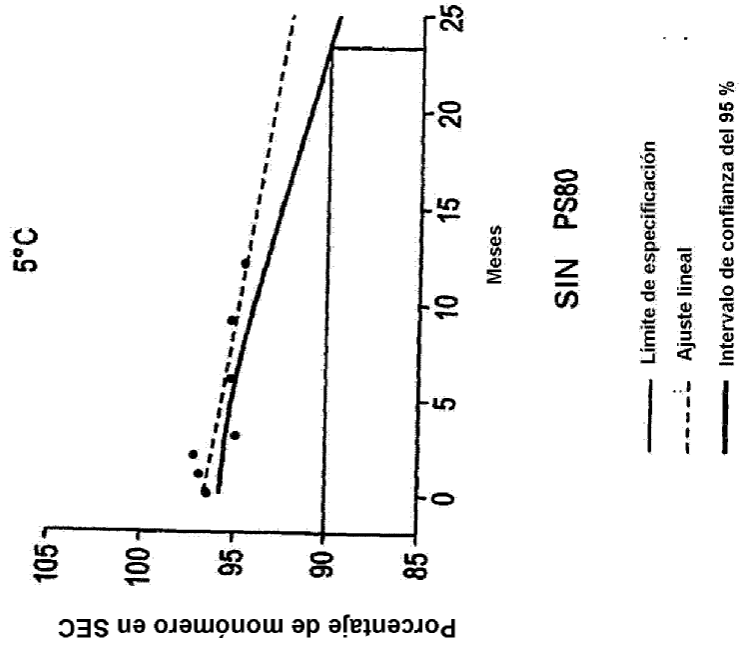


FIG. 3A

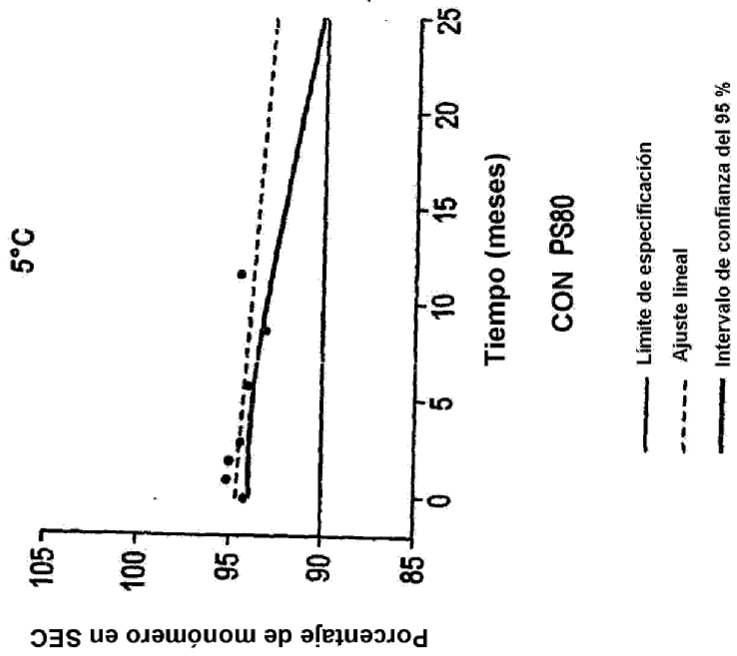


FIG. 4B

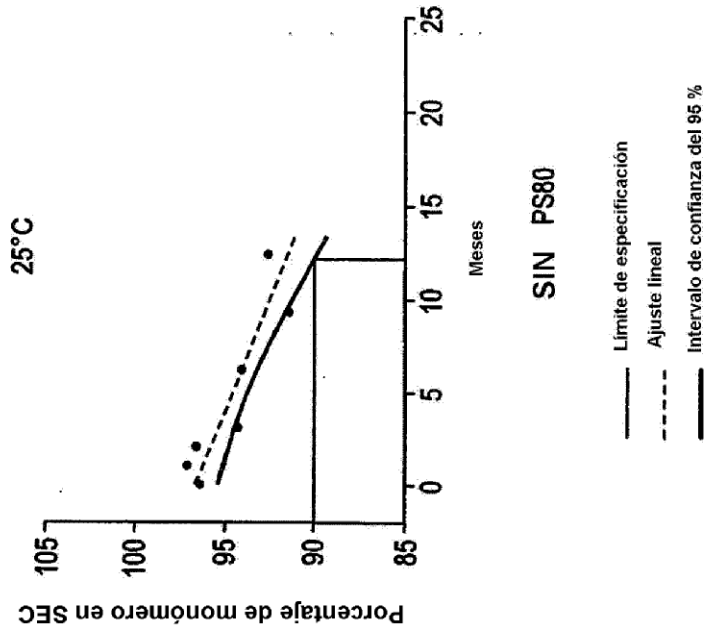


FIG. 4A

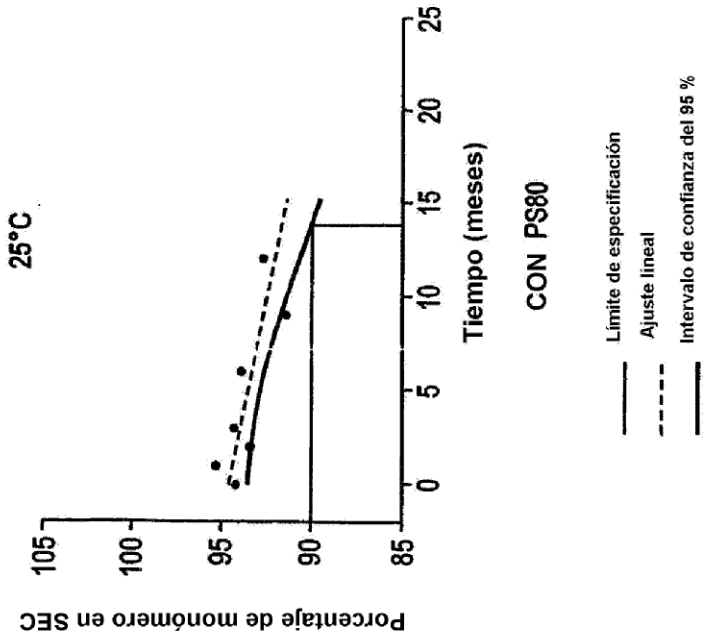


FIG. 5A

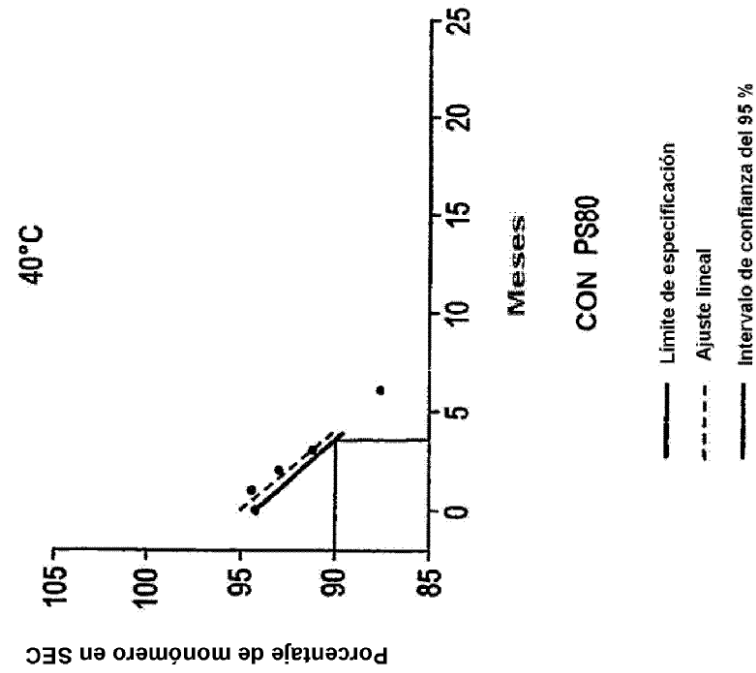


FIG. 5B

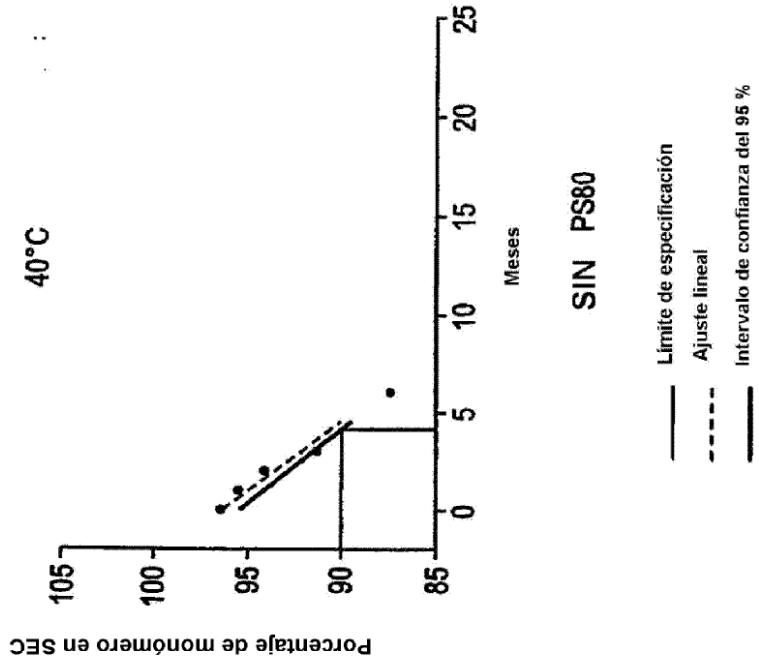


FIG. 6

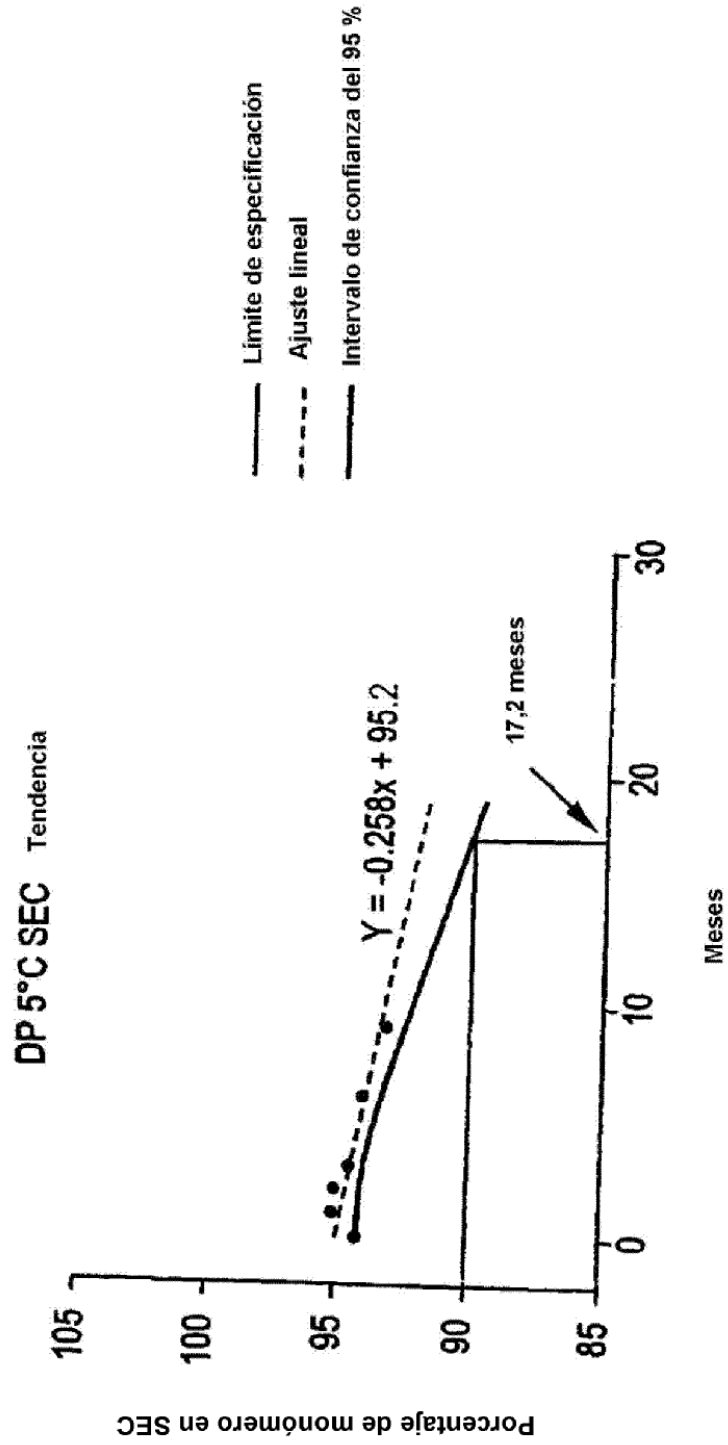


FIG. 7A

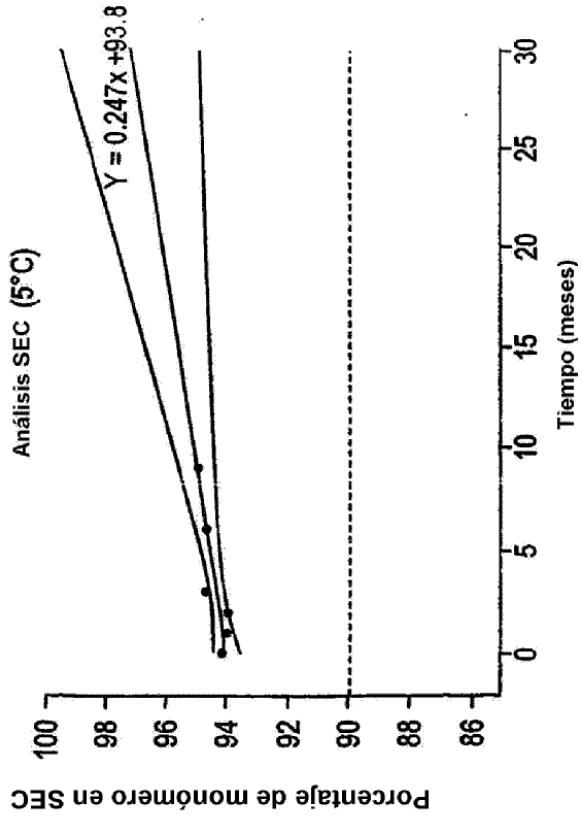


FIG. 7B

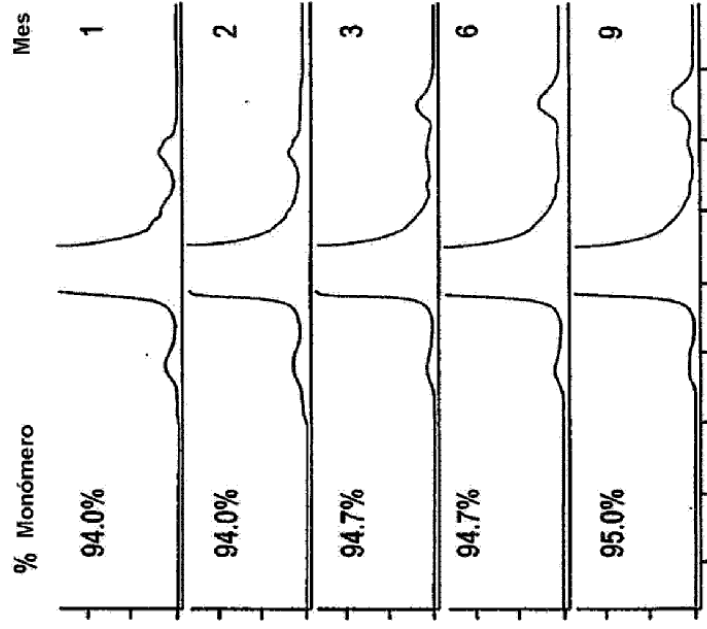


FIG. 8

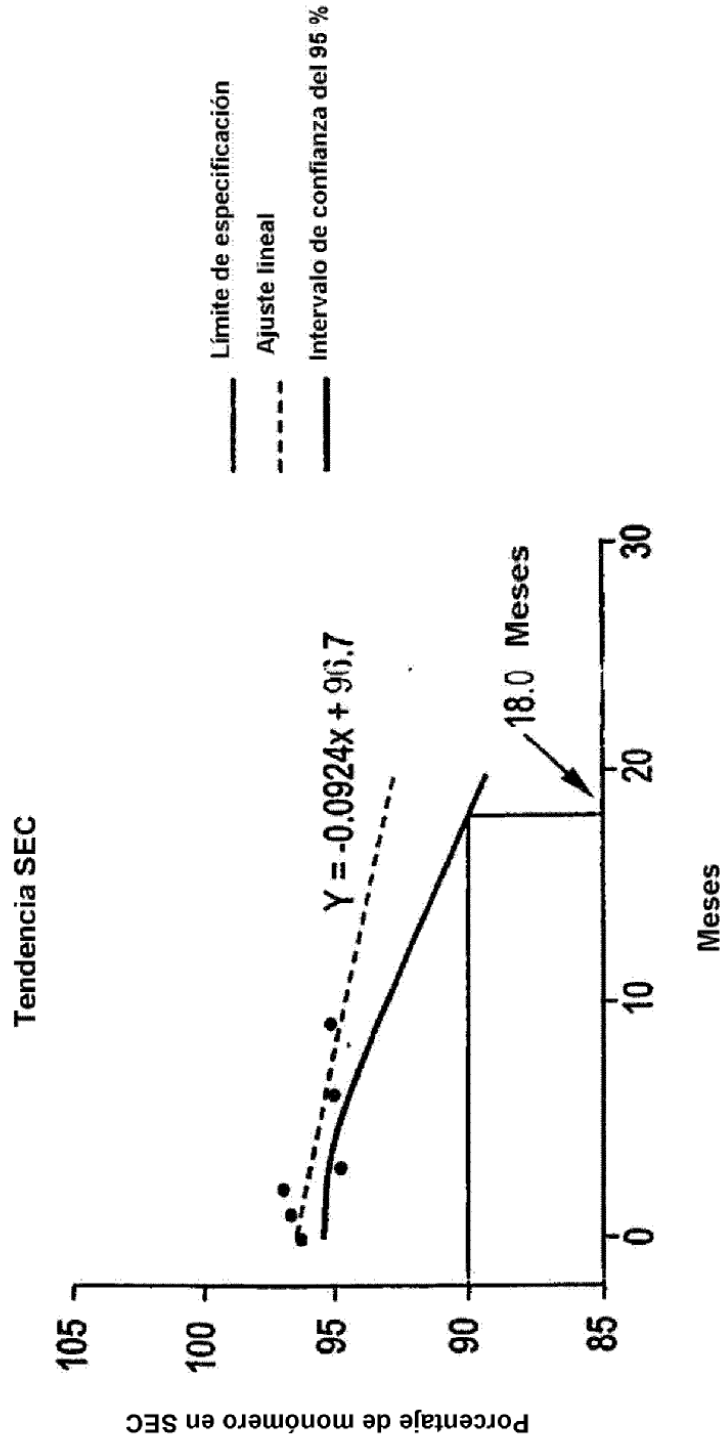


FIG. 9

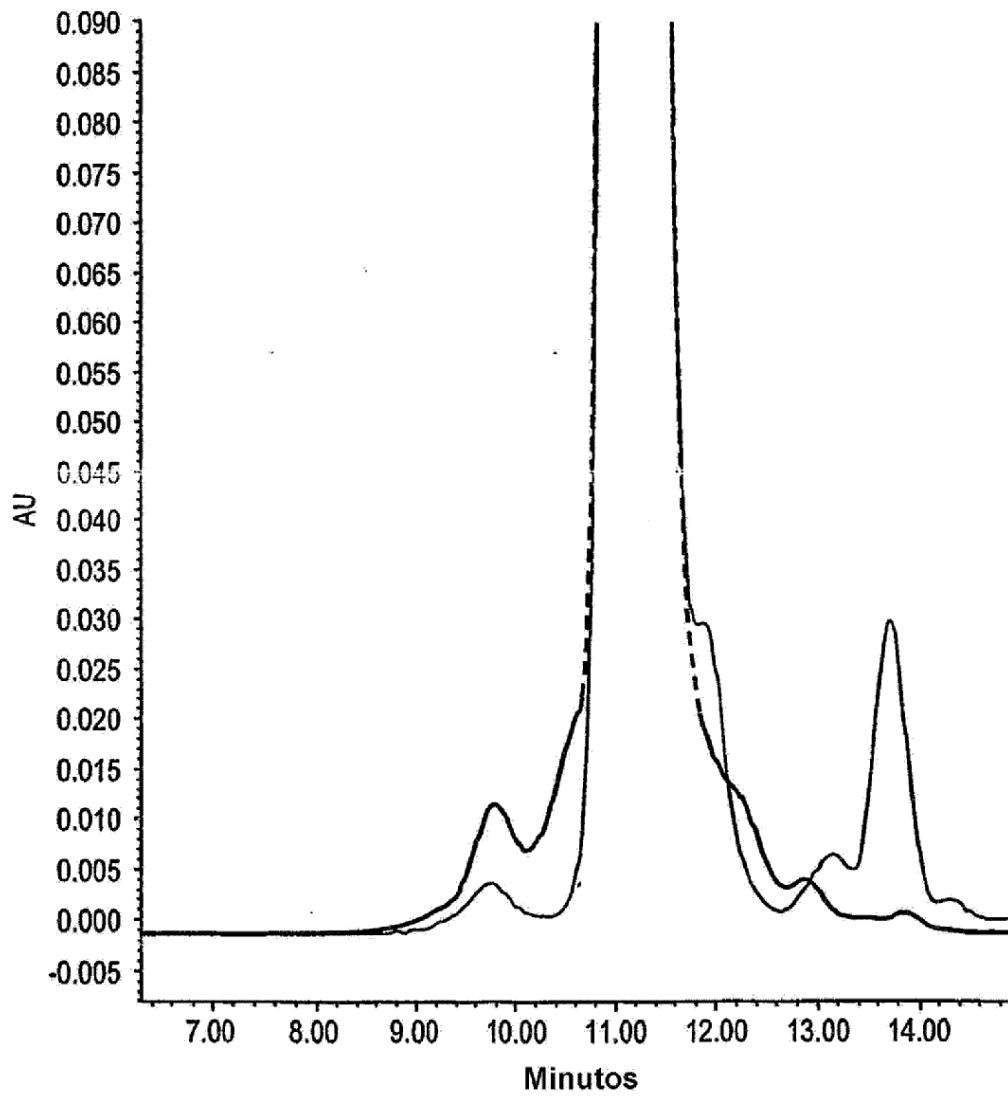
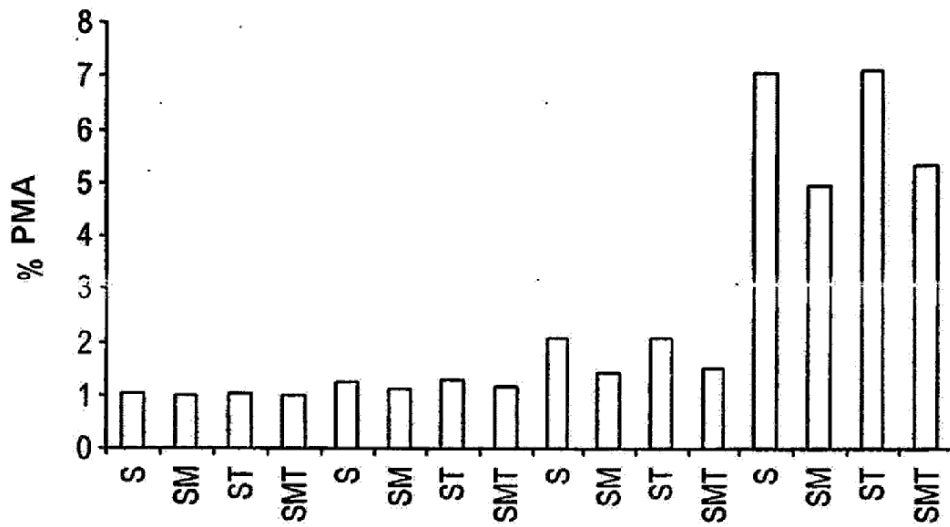


FIG. 10

SEC-HPLC % PMA



S: Succinato 20 mM pH 6,0
SM: Succinato + metionina 10 mM
ST: Succinato + 0,01 % PS80
SMT: Succinato + met + PS80
 Concentración 14 mg/ml

FIG. 11A

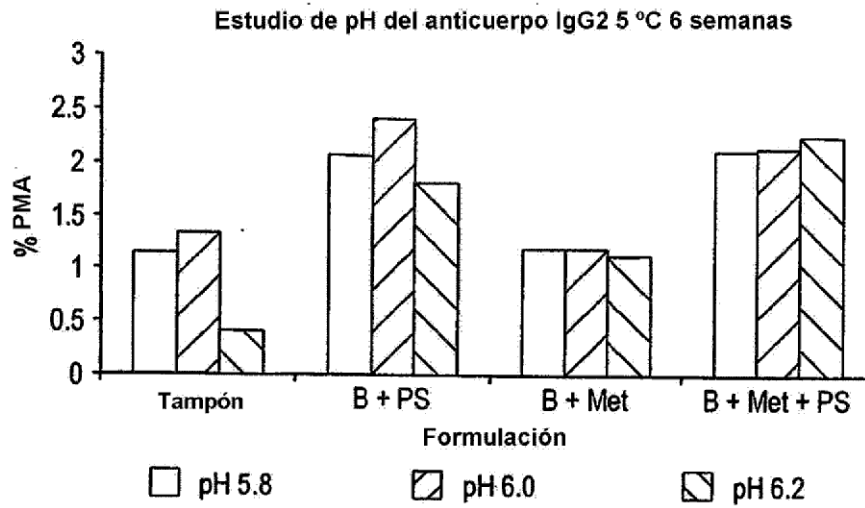
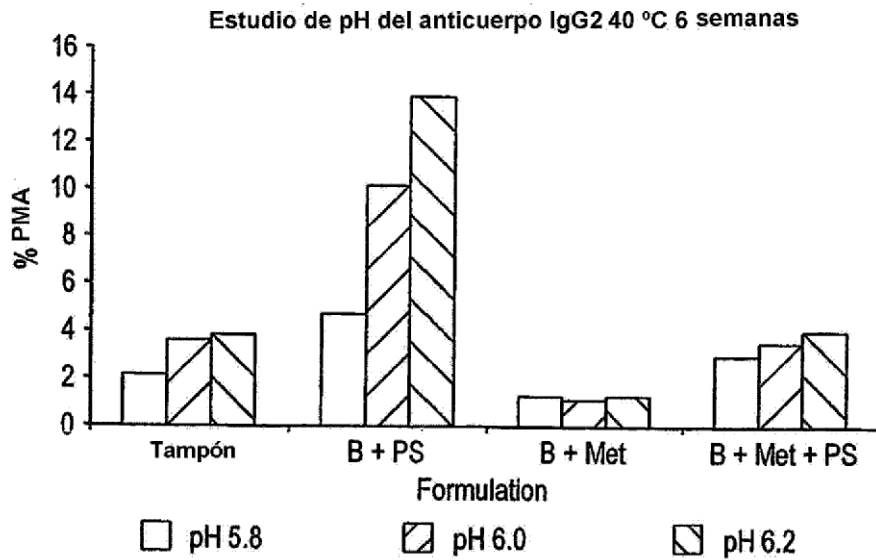


FIG. 11B



Tampón : Histidina 10 mM, 150 mM NaCl
 B+PS: Histidina 10 mM, 150 mM NaCl, 0.01% PS80
 B+Met: Histidina 10 mM, 150 mM NaCl, metionina 10 mM
 B+Met+PS: Histidina 10 mM, 150 mM NaCl, metionina 10 mM 0.01%PS80
 Concentración 1 mg/ml