

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 779**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2008** **E 08850454 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013** **EP 2219675**

54 Título: **Formulaciones para proteínas de fusión TACI-inmunoglobulina**

30 Prioridad:

12.11.2007 EP 07120489

12.11.2007 EP 07120490

14.11.2007 US 3028 P

14.11.2007 US 2988 P

27.03.2008 EP 08005923

27.03.2008 US 72038 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

07.01.2014

73 Titular/es:

**ARES TRADING S.A. (100.0%)
ZONE INDUSTRIELLE DE L'OURIETTAZ
1170 AUBONNE, CH**

72 Inventor/es:

**DEL RIO, ALESSANDRA;
RINALDI, GIANLUCA y
RICHARD, JOEL**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 436 779 T3

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).

DESCRIPCIÓN

Formulaciones para proteínas de fusión TACI-inmunoglobulina.

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención está en el campo de las formulaciones de proteínas terapéuticas. Más específicamente, se refiere a formulaciones para proteínas de fusión TACI-inmunoglobulina (Ig) que tienen un intervalo de pH de 4,5 a 5,5, como se define en las reivindicaciones.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Familia del ligando receptor BlyS

15 **[0002]** Se han identificado tres receptores, TACI (activador transmembrana e interactor de CAML), BCMA (antígeno de maduración de linfocitos B) y BAFF-R (receptor para el factor activante de linfocitos B), que tienen afinidades de unión únicas para los dos factores de crecimiento BlyS (estimulador de linfocitos B) y APRIL (un ligando de inducción de la proliferación) (Marsters y col. 2000; Thompson y col. 2001)

20 **[0003]** Tanto TACI como BCMA se unen a BlyS y APRIL, mientras que parece que BAFF-R es capaz de unirse solo a BlyS con alta afinidad (Marsters y col., 2000; Thompson y col. 2001). Como resultado, BlyS es capaz de señalizar a través de los tres receptores, mientras que parece que APRIL solo es capaz de señalizar a través de TACI y BCMA. Además, se han identificado complejos heterodímeros en la circulación de BlyS y APRIL (agrupamientos de tres subunidades de proteínas, que contienen una o dos copias de cada una de las subunidades de BlyS y APRIL) en muestras de suero tomadas de pacientes con enfermedades reumáticas basadas en sistema inmunitario, y se ha mostrado que inducen la proliferación de linfocitos B in vitro (Roschke y col., 2002).

25 **[0004]** BlyS y APRIL son estimuladores potentes de la maduración, proliferación y supervivencia de linfocitos B (Moore y col., 1999; Schneider y col., 1999; Do y col., 2000). BlyS y APRIL pueden ser necesarios para la persistencia de las enfermedades autoinmunitarias, en especial las que implican linfocitos B. Ratones transgénicos genéticamente modificados para expresar niveles altos de BlyS presentan trastornos de células inmunitarias y presentan síntomas similares a los observados en pacientes con lupus eritematoso sistémico (Gross y col. 2000; Mackay y col. 1999). Igualmente, se han medido niveles aumentados de BlyS/APRIL en muestras de suero tomadas de pacientes con lupus eritematoso sistémico y otros pacientes con diferentes enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide (Roschke 2002; Cheema y col. 2001; Groom y col. 2002), que extienden la asociación de BlyS y/o APRIL y las enfermedades mediadas por linfocitos B de modelos animales a seres humanos. La expresión de BlyS y APRIL está regulada por aumento en monocitos de sangre periférica y linfocitos T de pacientes con EM (Thangarajh y col., 2004; Thangarajh y col., 2005). En las lesiones de EM, se encontró que la expresión de BlyS era muy regulada por aumento en astrocitos localizados cerca de las células inmunitarias que expresan BAFF-R (Krumbholz y col., 2005).

Atacicept

45 **[0005]** Atacicept (INN) es una proteína de fusión recombinante que contiene la parte extracelular de unión al ligando del receptor TACI (activador transmembrana y modulador de calcio e interactor del ligando de la ciclofilina (CAML)) y la parte Fc modificada de la IgG humana. Atacicept actúa como un antagonista de BlyS (estimulador de linfocitos B) y APRIL (un ligando de inducción de la proliferación), ambos miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF). Se ha mostrado que BlyS y APRIL son reguladores importantes de la función de maduración y supervivencia de linfocitos B.

50

[0006] Atacicept es una glicoproteína soluble que contiene 313 aminoácidos, que resulta de la fusión de una IgG₁-Fc humana y una porción del dominio extracelular del receptor de BlyS de TACI, con una masa prevista de 35,4 kilodalton (kDa). La conformación del producto es dimérica, con una masa prevista de 73,4 kDa. Atacicept se produce en células de ovario de hámster chino (CHO) por tecnología recombinante.

55

[0007] En atacicept la IgG₁-Fc humana se modificó para reducir la unión de Fc al componente C1q del complemento y la interacción con receptores de anticuerpos (Tao y col., 1993; Canfield y col., 1991). Se ensayó atacicept y se confirmó la reducción de estas funciones efectoras de Fc.

Formulaciones de proteínas terapéuticas

[0008] Las proteínas de fusión TACI-Ig como atacicept, son biológicas, es decir, proteínas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades humanas y por lo tanto para la administración humana.

[0009] Se desarrollan formulaciones con el fin de apoyar el suministro satisfactorio de proteínas terapéuticas. Los problemas que se encuentran con frecuencia en el contexto de las proteínas terapéuticas son, p. ej., la poca estabilidad de la proteína (a menudo es necesario el almacenamiento en el frigorífico o congelador), poca biodisponibilidad, y formas farmacéuticas antipáticas para el paciente, normalmente por vía parenteral

[0010] En los procedimientos de producción biotecnológica, las proteínas terapéuticas en general se obtienen en una forma muy purificada en disolución acuosa. Cuando se formulan estas disoluciones de proteínas, p. ej., para el suministro parenteral, es importante la estabilización de la proteína. Por lo tanto, deben seleccionarse excipientes que estabilicen la proteína. A la estabilidad de proteínas muy purificadas en disolución también le puede afectar el tampón. Los tampones afectan a la estabilidad de una proteína en disolución tanto por la fuerza iónica como por el pH de la disolución. Los ejemplos de tampones que se han usado para este propósito son tampones de fosfato, citrato, maleato y succinato.

[0011] Incluso si la proteína terapéutica esta en disolución al inicio de su vida en anaquel, el reto es mantener la proteína en disolución y prevenir la agregación durante el almacenamiento, que conduce a la formación de partículas o la precipitación, y prevenir la degradación (p. ej., por hidrólisis, oxidación, desamidación, truncado o desnaturalización).

[0012] La temperatura también influye en la solubilidad. Normalmente, la solubilidad aumenta con la temperatura. Sin embargo, por encima de un determinado umbral de temperatura, la proteína puede desplegarse parcialmente conduciendo a una menor solubilidad o a la agregación/precipitación.

[0013] Con el fin de prevenir la agregación y degradación y con el fin de obtener un fármaco que es estable a lo largo de un periodo de tiempo prolongado, es necesario desarrollar una formulación que contenga uno o más excipientes que estabilicen la proteína terapéutica.

[0014] La presente invención aborda la necesidad de una formulación estable y farmacéuticamente aceptable de proteínas de fusión TACI-inmunoglobulina, que se usan como proteínas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad humana.

[0015] El documento WO 01/60397 describe agonistas y antagonistas de moléculas relacionadas con el factor de necrosis tumoral (TNF) y usos de los mismos.

[0016] El documento WO 02/094852 describe proteínas de fusión TACI-inmunoglobulina para usar como compuestos terapéuticos.

[0017] El documento WO 2007/059188 describe un anticuerpo dirigido contra CD-20 para usar en el tratamiento del daño articular.

[0018] El documento US 2006/067933 describe polipéptidos relacionados con el receptor de TNF solubles, polinucleótidos y composiciones relacionadas, y usos de los mismos.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0019] La presente invención se basa en el desarrollo de formulaciones estables para proteínas de fusión TACI-inmunoglobulina.

[0020] En un primer aspecto, la formulación de la invención comprende:

a) Proteína de fusión TACI-inmunoglobulina (TACI-Ig) que comprende

- i. el dominio extracelular de TACI o un fragmento o variante del mismo que se une a Blys y/o APRIL; y
- ii. un dominio constante de inmunoglobulina; y

b) un tampón de acetato que tampona la formulación a un pH en el intervalo entre 4,9 y 5,1; y

c) trealosa en una concentración en el intervalo de 600 a 100 mg/ml.

5 **[0021]** En un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende dicha formulación.

[0022] Un tercer aspecto de la invención se refiere a la formulación o la composición farmacéutica de la invención para usar en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno linfoproliferativo.

10

[0023] La memoria descriptiva describe un procedimiento para preparar una formulación de acuerdo con la invención, que comprende la etapa de preparar una disolución líquida de la proteína de fusión TACI-Ig y ajustar el pH de dicha disolución líquida a un pH en el intervalo de 4,5 a 5,5.

15 **[0024]** Un procedimiento para preparar una formulación de acuerdo con la invención puede comprender la etapa de cargar una cantidad predeterminada de la formulación en un recipiente estéril.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 **[0025]** La presente invención se basa en el desarrollo de una formulación para proteínas de fusión TACI-inmunoglobulina (TACI-Ig), en las que la proteína de fusión TACI-Ig es estable a lo largo de un periodo de tiempo prolongado (p. ej., más de 3 meses, más de 6 meses, más de 12 meses, más de 15 meses o más de 18 meses).

[0026] De acuerdo con la presente invención, la formulación comprende:

25

a) Proteína de fusión TACI-inmunoglobulina (TACI-Ig) que comprende

- i. el dominio extracelular de TACI o un fragmento o variante del mismo que se une a BlyS y/o APRIL; y
- ii. un dominio constante de inmunoglobulina; y

30

b) un tampón de acetato que tampona la formulación a un pH en el intervalo entre 4,9 y 5,1; y c) trealosa en una concentración en el intervalo de 600 a 100 mg/ml.

[0027] En la formulación de la invención, el pH de la formulación tiene un pH en el intervalo de 4,9 a 5,1.

35

[0028] Por lo tanto, la formulación puede tener p. ej. un pH de 4,9, 5,0 o 5,1. En una realización preferida, el pH de la formulación es 5,0.

40 **[0029]** El tampón usado en la formulación de la invención es tampón de acetato. El tampón puede tener una concentración en el intervalo de 1 a 50 mM, preferiblemente de 5 a 25 mM. Por ejemplo, el tampón comprendido en la formulación de la invención puede tener una concentración de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 mM.

45 **[0030]** En una realización preferida de la formulación de la invención, el tampón es tampón de acetato sódico (acetato-Na). En una realización de la invención, el tampón es tampón de acetato-Na de 5 a 25 mM, preferiblemente de 8 a 12 mM, más preferiblemente aproximadamente 10 mM.

50 **[0031]** En una realización, la formulación de la invención comprende un excipiente. Los excipientes adecuados son, p. ej., manitol, sorbitol, glicina o trealosa. El manitol o el sorbitol por ejemplo, pueden estar presentes en la formulación en una concentración en el intervalo de 10 a 30 o preferiblemente de 15 a 25 ó 20 ó 21 mg/ml.

[0032] La trealosa es un disacárido (azúcar) compuesto de dos moléculas de glucosa unidas por un enlace alfa,alfa-1,1. La trealosa, tal como trealosa anhidra, está presente en la formulación de la invención en una concentración en el intervalo de 60 a 100 mg/ml. Por ejemplo, la formulación puede comprender trealosa 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 100 mg/ml. En una realización preferida, la formulación comprende aproximadamente 80 mg/ml de trealosa anhidra.

[0033] Aunque la formulación de la invención puede comprender un excipiente o sal tal como NaCl, CaCl₂, MgCl₂, en el contexto de la presente invención se prefiere que la formulación esté exenta de sales.

[0034] La formulación puede comprender además un tensioactivo, tal como p. ej., Tween 20 o preferiblemente Poloxamer 188 (Lutrol® o Pluronic® F68). De acuerdo con una realización de la invención, la formulación está exenta de tensioactivo.

5

[0035] En una realización, la formulación de la invención comprende además un conservante. Se prefiere usar alcohol bencílico en combinación con cloruro de benzalconio como conservante. Por ejemplo, la formulación puede comprender de 0,1% a 0,5% de alcohol bencílico, p. ej. 0,2%, 0,3% o 0,4% de alcohol bencílico y de 0,0007% a 0,0015% de cloruro de benzalconio, p. ej. 0,0008%, 0,0009%, 0,001%, 0,0011% o 0,0012% de cloruro de benzalconio. En una realización muy preferida, la formulación comprende 0,3% de alcohol bencílico con 0,001% de cloruro de benzalconio.

10

[0036] La formulación de la presente invención comprende proteína de fusión TACI-inmunoglobulina (TACI-Ig) como el compuesto terapéuticamente activo, es decir, como el principio activo. Dicha proteína de fusión TACI-Ig comprende o consiste en (a) el dominio extracelular de TACI o una variante o fragmento del mismo que se une a BlyS y/o APRIL; y (b) un dominio constante de inmunoglobulina. El experto en la materia entiende que una proteína de fusión TACI-Ig para formular de acuerdo con la presente invención, no es un anticuerpo dirigido contra TACI. Un anticuerpo dirigido contra TACI no comprendería el dominio extracelular de TACI o una variante o fragmento del mismo que se une a BlyS y/o APRIL, si no que estaría dirigido contra un epítipo del dominio extracelular de TACI.

15

[0037] En el marco de la presente invención, la expresión "dominio extracelular de TACI" también se refiere a cualquier variante del mismo que es al menos 80% u 85%, preferiblemente al menos 90% o 95% idéntica al dominio extracelular de TACI (SEQ ID NO: 1). La expresión "dominio extracelular de TACI" también incluye variantes que no comprenden más de 50 ó 40 ó 30 ó 20 ó 10 ó 5 ó 3 ó 2 ó 1 sustituciones de aminoácidos conservativas. Cualquiera de dichas variantes es capaz de unirse a BlyS y/o APRIL y/o cualquier heterotrímero de BlyS-APRIL. Preferiblemente, dicha variante también inhibe la actividad biológica de BlyS y/o de APRIL y/o de cualquier heterotrímero de BlyS/APRIL. La actividad biológica de BlyS o APRIL es, p. ej., la proliferación de linfocitos B.

20

[0038] En el contexto de la presente invención también se pueden usar fragmentos (fragmentos activos) y variantes del dominio extracelular de TACI, siempre que el fragmento sea capaz de unirse a BlyS y/o APRIL y/o un heterotrímero de BlyS-APRIL. Preferiblemente, dicho fragmento también inhibe o reduce la actividad biológica de BlyS y/o de APRIL y/o de un heterotrímero de BlyS-APRIL.

25

[0039] La capacidad de cualquier dominio extracelular de TACI, proteína de fusión TACI-Ig, o cualquier variante o fragmento del mismo para unirse a BlyS y/o APRIL y/o heterotrímero de BlyS/APRIL, se puede evaluar, por ejemplo, de acuerdo con el ejemplo 2, más adelante. La capacidad para inhibir o reducir la capacidad biológica de BlyS, APRIL o el heterotrímero de BlyS/APRIL se puede evaluar, por ejemplo, de acuerdo con el ejemplo 3, más adelante.

30

[0040] En el contexto de la presente invención, se prefiere que cualquiera de dichos fragmentos o variantes de un dominio extracelular de TACI o una proteína de fusión TACI-Ig, no tenga actividad biológica que sea significativamente menor que la de ataccept, es decir una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

35

[0041] La expresión "dominio constante de inmunoglobulina (Ig)", como se usa en el presente documento, también se llama un "dominio Fc" y deriva de una inmunoglobulina (Ig) humana o animal que preferiblemente es una IgG. La IgG puede ser una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. El dominio Fc preferiblemente comprende al menos el dominio CH2, CH3 de la IgG1, preferiblemente junto con la región bisagra.

40

[0042] Preferiblemente, el dominio constante de Ig es un dominio de IgG1 humana.

45

[0043] En una realización, el dominio constante de la IgG1 humana se ha modificado para una menor citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

50

[0044] En la ADCC, el dominio Fc de un anticuerpo se une a los receptores de Fc (FcγR) en la superficie de las células inmunoefectoras tales como los linfocitos citolíticos naturales y macrófagos, conduciendo a la fagocitosis o lisis de las células diana. En la CDC, los anticuerpos matan las células diana desencadenando la cascada del complemento en la superficie celular. La unión de la IgG a los FcγR activantes (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa y FcγRIIIb) e inhibidores (FcγRIIb) o el primer componente del complemento (C1q) depende de los restos localizados en la región bisagra y el dominio CH2. Dos regiones del dominio CH2 son importantes para la unión de los FcγR y el

55

complemento C1q, y tienen secuencias únicas en IgG2 e IgG4. Por ejemplo, la sustitución de los restos de IgG2 en las posiciones 233-236 en la IgG1 humana reducía mucho la ADCC y CDC (Armour y col., 1999 y Shields y col., 2001). Las siguientes mutaciones de Fc, de acuerdo con las posiciones del índice EU (Kabat y col., 1991), se pueden introducir, por ejemplo, en un Fc derivado de la IgG1:

T250Q/M428L
M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F
E233P/L234V/L235A/ Δ G236 + A327G/A330S/P331S
E333A; K322A.

[0045] Otras mutaciones de Fc pueden ser, por ejemplo, las sustituciones en las posiciones del índice EU seleccionadas de 330, 331 234 ó 235, o combinaciones de las mismas. También se puede introducir una sustitución de aminoácido en la posición del índice EU 297 localizada en el dominio CH2, en el dominio Fc en el contexto de la presente invención, eliminando un potencial sitio de unión de hidrato de carbono unido a N. El resto de cisteína en la posición del índice EU 220 también se puede sustituir por un resto de serina, eliminando el resto de cisteína que normalmente forma enlaces disulfuro con la región constante de la cadena ligera de inmunoglobulina.

[0046] Se han preparado dominios Fc particulares adecuados para las proteínas de fusión TACI-Ig para usar de acuerdo con la presente invención.

[0047] Específicamente, se generaron 6 versiones de un Fc de IgG1 humana modificado para crear proteínas de fusión de Fc y se denominan Fc- 488, así como Fc4, Fc5, Fc6, Fc7 y Fc8. Fc- 488 (que tiene una secuencia de ADN de SEQ ID NO: 4 y una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5) se diseñó para la clonación conveniente de una proteína de fusión que contiene la región Fc γ 1 humana, y se construyó usando la región constante γ 1 de la inmunoglobulina humana natural como molde. La preocupación sobre los potenciales efectos perjudiciales debido a un resto de cisteína desemparejado condujeron a la decisión de sustituir la cisteína que normalmente forma enlaces disulfuro con la región constante de la cadena ligera de la inmunoglobulina por un resto de serina. Se introdujo un cambio adicional en el codón que codifica la posición del índice EU 218 para introducir un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción Bg III para facilitar las futuras manipulaciones del ADN. Estos cambios se introdujeron en el producto de la PCR codificado en los cebadores de la PCR. Debido a la localización del sitio BgIII y con el fin de completar la región bisagra de Fc, se incorporaron los codones para las posiciones del índice EU 216 y 217 en las secuencias de la pareja de la proteína de fusión. Fc4, Fc5 y Fc6 contienen mutaciones para reducir las funciones efectoras mediadas por el Fc reduciendo la unión de Fc γ RI y la unión del complemento C1q. Fc4 contiene las mismas sustituciones de aminoácidos que se introdujeron en Fc-488. Se introdujeron sustituciones de aminoácidos adicionales para reducir las potenciales funciones efectoras mediadas por Fc. Específicamente, se introdujeron 3 sustituciones de aminoácidos para reducir la unión de Fc γ RI. Estas son las sustituciones en las posiciones del índice EU 234, 235 y 237. Las sustituciones en estas posiciones han mostrado reducir la unión de Fc γ RI (Duncan y col., 1988). Estas sustituciones de aminoácidos también pueden reducir la unión de Fc γ RIIa, así como la unión de Fc γ RIII (Sondermann y col., 2000; Wines y col., 2000).

[0048] Varios grupos han descrito la importancia de las posiciones del índice EU 330 y 331 en la unión del complemento C1q y posterior fijación del complemento (Canfield y Morrison, 1991; Tao y col., 1993). Se introdujeron sustituciones de aminoácidos en estas posiciones en Fc4 para reducir la fijación del complemento. El dominio CH3 de Fc4 es idéntico al encontrado en el correspondiente polipéptido natural, excepto por el codón de parada, que se cambió de TGA a TAA para eliminar un potencial sitio de metilación Dam cuando el ADN clonado se desarrolla en Dam más cepas de E. coli.

[0049] En Fc5, el resto de arginina en la posición del índice EU 218 se volvió a mutar a lisina, porque el esquema de clonación de BgIII no se usó en las proteínas de fusión que contenían este Fc particular. El resto de la secuencia de Fc5 se corresponde con la descripción anterior para Fc4.

[0050] Fc6 es idéntico a Fc5 excepto que se ha eliminado el codón de la lisina carboxilo terminal. La lisina C-terminal de inmunoglobulinas maduras se elimina con frecuencia de las inmunoglobulinas maduras postraduccionalmente antes de la secreción de linfocitos B, o se elimina durante la circulación en el suero. Por consiguiente, el resto de lisina C-terminal típicamente no se encuentra en los anticuerpos en la circulación. Como en los Fc4 y Fc5 anteriores, el codón de parada en la secuencia Fc6 se cambió a TAA.

[0051] Fc7 es idéntico a Fc γ 1 natural excepto por una sustitución de aminoácido en la posición del índice EU 297 localizada en el dominio CH2. La posición del índice EU Asn-297 es un sitio de unión de hidrato de carbono unido a

N. El hidrato de carbono unido a N introduce una fuente potencial de variabilidad en una proteína expresada de forma recombinante debido a las potenciales variaciones de lote a lote en la estructura del hidrato de carbono. En un intento de eliminar esta potencial variabilidad, Asn-297 se mutó a un resto de glutamina para prevenir la unión del hidrato de carbono unido a N en esta posición de resto. El hidrato de carbono en el resto 297 también está implicado en la unión de Fc a FcRIII (Sondermann y col., *Nature* 406:267 (2000)). Por lo tanto, la eliminación del hidrato de carbono debería disminuir la unión del Fc7 recombinante que contiene proteínas de fusión a los FcγR en general. Como antes, el codón de parada en la secuencia Fc7 se mutó a TAA.

10 **[0052]** Fc8 es idéntico a la región γ1 de la inmunoglobulina natural mostrada en la SEQ ID NO: 4, excepto que el resto de cisteína en la posición del índice EU 220 se sustituyó por un resto de serina. Esta mutación eliminaba el resto de cisteína que normalmente forma enlaces disulfuro con la región constante de la cadena ligera de inmunoglobulina.

15 **[0053]** El uso de cualquiera de estos dominios de Fc específicos para la formación de una proteína de fusión TACI-Ig está dentro del alcance de la presente invención.

20 **[0054]** El dominio constante de inmunoglobulina de TACI-Ig preferiblemente comprende o consiste en un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 2, o una variante de la misma, que es al menos 80% u 85%, preferiblemente al menos 90% o 95% o 99% idéntica al dominio constante de Ig de SEQ ID NO: 2, o una variante que comprende menos de 50 ó 40 ó 30 ó 20 ó 10 ó 5 ó 3 ó 2 sustituciones de aminoácidos conservativas, con la condición de que no tenga impacto en la actividad biológica general de la proteína de fusión TACI-Ig, y que la inmunogenicidad de la proteína TACI-Ig no sea significativamente más alta de la de atacicept (SEQ ID NO: 3).

25 **[0055]** En el contexto de la presente invención, el término "identidad" refleja una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos, determinada por comparación de las secuencias. En general, identidad se refiere a una correspondencia exacta de aminoácido a aminoácido de las dos secuencias de polipéptido, respectivamente, a lo largo de la longitud de la secuencia que se compara.

30 **[0056]** Para secuencias en las que no hay una correspondencia exacta, se puede determinar un "% de identidad". En general, las dos secuencias que se comparan se alinean para dar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir insertar "huecos" en una o ambas secuencias, para potenciar el grado de alineamiento. Se puede determinar un % de identidad a lo largo de toda la longitud de cada una de las secuencias que se comparan (llamado alineamiento global), que es particularmente adecuado para secuencias de igual longitud o muy similar, o a lo largo de longitudes más cortas definidas (llamadas alineamiento local), que es más adecuado para las secuencias de longitudes distintas.

35 **[0057]** Los procedimientos para comparar la identidad de dos o más secuencias son bien conocidos en la materia. Así, por ejemplo, se pueden usar programas disponibles en Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 9.1 (Devereux J y col., 1984), por ejemplo, los programas BESTFIT y GAP, para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de identidad entre dos secuencias de polipéptido. BESTFIT usa el algoritmo de "homología local" de Smith y Waterman (1981) y encuentra la mejor región individual de similitud entre dos secuencias. También se conocen en la materia otros programas para determinar la identidad de dos secuencias, por ejemplo, la familia de programas BLAST (Altschul S F y col., 1990, Altschul S F y col., 1997, accesible a través de la página de inicio del NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson W R, 1990).

40 **[0058]** Las sustituciones de aminoácidos preferidas de acuerdo con la presente invención son las que se conocen como sustituciones "conservativas". Las sustituciones conservativas de aminoácidos del dominio extracelular de TACI o la parte del dominio constante de inmunoglobulina de la proteína de fusión TACI-Ig, incluyen aminoácidos sinónimos en un grupo que tiene propiedades fisicoquímicas suficientemente similares para que la sustitución entre miembros del grupo conserve la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Está claro que también se pueden hacer inserciones y eliminaciones de aminoácidos en las secuencias definidas antes sin alterar su función, en particular si las inserciones o eliminaciones implican solo unos pocos aminoácidos, p. ej., menos de 50 o menos de 30, menos de 20 o preferiblemente menos de 10 o menos de 5 restos de aminoácidos, y no eliminan o desplazan aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, tales como, p. ej., restos de cisteína. Se pueden usar proteínas y variantes producidas por dichas eliminaciones y/o inserciones para el tratamiento de la EM recurrente, con la condición de que su actividad biológica no sea significativamente menor que la actividad biológica de atacicept (una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3).

[0059] Las solicitudes de patente internacional publicadas como WO 00/40716 y WO 02/094852 describen secuencias para el dominio extracelular de TACI así como fragmentos específicos del dominio extracelular de TACI que interaccionan con sus ligandos, BlyS y APRIL.

- 5 **[0060]** Como se describe, por ejemplo, en el documento WO 00/40716, el dominio extracelular de TACI comprende dos repeticiones ricas en cisteínas (Cys) que son características para miembros de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), a la que pertenece el receptor TACI. En el documento WO 00/40716 también se ha establecido que una variante de corte y empalme de TACI, denominada BR42x2, que comprende solo la segunda repetición rica en Cys menos conservada, se podía unir a BlyS. Por lo tanto, en el marco de la presente
- 10 invención, el fragmento del dominio extracelular de TACI preferiblemente al menos comprende o consiste en los restos de aminoácidos 71 a 104 de la SEQ ID NO: 1, que corresponden a la segunda repetición rica en Cys. Se prefiere además que la proteína de fusión TACI-Ig comprenda además los restos de aminoácidos 34 a 66 de la SEQ ID NO: 1, que corresponde a la primera repetición rica en Cys.
- 15 **[0061]** En una realización adicional de la presente invención, dicho fragmento del dominio extracelular de TACI, que se une a e inhibe la actividad de BlyS y/o APRIL, comprende o consiste en los restos de aminoácidos 30 a 110 de la SEQ ID NO: 1.
- [0062]** En una realización adicional más de la presente invención, la proteína de fusión TACI-Ig comprende o
- 20 consiste en un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3, o una variante de la misma que es al menos 90% o 95% o 98% o 99% idéntica a la misma o que tiene menos de 30 ó 20 ó 15 ó 10 ó 5 ó 3 ó 2 sustituciones de aminoácidos conservativas, uniéndose la variante a BlyS y/o APRIL.
- [0063]** En una realización adicional más de la invención, la proteína de fusión TACI-Ig comprende o consiste en un
- 25 polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 8, o una variante de la misma que es al menos 90% o 95% o 98% o 99% idéntica a la misma o que tiene menos de 30 ó 20 ó 15 ó 10 ó 5 ó 3 ó 2 sustituciones de aminoácidos conservativas, uniéndose la variante a BlyS y/o APRIL.
- [0064]** En una realización adicional más de la invención, la proteína de fusión TACI-Ig comprende o consiste en un
- 30 polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 10, o una variante de la misma que es al menos 90% o 95% o 98% o 99% idéntica a la misma o que tiene menos de 30 ó 20 ó 15 ó 10 ó 5 ó 3 ó 2 sustituciones de aminoácidos conservativas, uniéndose la variante a BlyS y/o APRIL.
- [0065]** En una realización adicional más de la invención, la proteína de fusión TACI-Ig comprende o consiste en un
- 35 polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 12, o una variante de la misma que es al menos 90% o 95% o 98% o 99% idéntica a la misma o que tiene menos de 30 ó 20 ó 15 ó 10 ó 5 ó 3 ó 2 sustituciones de aminoácidos conservativas, uniéndose la variante a BlyS y/o APRIL.
- [0066]** En una realización adicional más de la invención, la proteína de fusión TACI-Ig comprende o consiste en un
- 40 polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 14, o una variante de la misma que es al menos 90% o 95% o 98% o 99% idéntica a la misma o que tiene menos de 30 ó 20 ó 15 ó 10 ó 5 ó 3 ó 2 sustituciones de aminoácidos conservativas, uniéndose la variante a BlyS y/o APRIL.
- [0067]** En otra realización de la invención, la formulación comprende una proteína de fusión TACI-Ig en una
- 45 concentración en el intervalo de 20 mg/ml a 180 mg/ml, p. ej., en una concentración de 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 mg/ml.
- [0068]** En una realización adicional de la invención, la formulación está en forma líquida (p. ej., acuosa).
- 50 **[0069]** En otra realización adicional más, la formulación es para la administración de múltiples dosis. En el contexto de una formulación de múltiples dosis se prefiere incluir un conservante. Como se ha mencionado antes, en una realización preferida, la formulación comprende alcohol bencílico (p. ej., al 0,3%) y cloruro de benzalconio (p. ej., al 0,001%).
- 55 **[0070]** La formulación de la proteína de fusión TACI-Ig puede ser para la administración diaria o en días alternos, preferiblemente dos veces por semana o semanalmente. Preferiblemente, la administración de TACI-Ig es una administración de bolo una vez por semana. Alternativamente, la formulación también puede ser para la administración en semanas alternas o una vez al mes.

[0071] La formulación de la presente invención puede ser, p. ej., para la vía intravenosa, subcutánea o intramuscular. En una realización de la invención, la formulación es para la administración subcutánea.

[0072] La formulación de la presente invención está dirigida al tratamiento de una enfermedad, preferiblemente para el tratamiento de una enfermedad humana. Por lo tanto, en una realización, la formulación de la invención se prepara como composición farmacéutica.

[0073] La formulación o composición que comprende la proteína de fusión TACI-Ig, preferiblemente es para usar en el tratamiento de, o para preparar un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno linfoproliferativo.

[0074] Una enfermedad autoinmunitaria, en el contexto de la presente invención, incluye, pero no está limitada a, p. ej., lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis lúpica, artritis reumatoide, esclerosis múltiple o neuritis óptica.

[0075] Un trastorno linfoproliferativo es una enfermedad en la que las células del sistema linfático crecen excesivamente. Las neoplasias malignas de linfocitos B, por ejemplo, son trastornos linfoproliferativos. Las neoplasias malignas de linfocitos B incluyen, pero sin limitar, leucemias y linfomas, tales como por ejemplo, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mieloblástica, leucemia promielocítica, leucemia mielomonocítica, eritroleucemia monocítica, leucemia crónica, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia linfocítica crónica, policitemia vera, enfermedad de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin, mieloma múltiple, y macroglobulinemia de Waldenstrom.

[0076] La presente invención también se refiere a un procedimiento (como se define en las reivindicaciones) para producir o preparar una formulación de acuerdo con la invención, que comprende la etapa de mezclar los componentes (a) a (c), preferiblemente en una disolución líquida (p. ej., acuosa).

[0077] La presente invención también se refiere a un procedimiento (como se define en las reivindicaciones) para producir o preparar una formulación de acuerdo con la invención, que comprende la etapa de poner una cantidad predeterminada de la formulación en un recipiente estéril. Una cantidad predeterminada puede ser, p. ej., de 0,5 a 5 ml, preferiblemente de 1 a 2 ml.

[0078] En una realización de la invención, el recipiente se selecciona de un vial de vidrio o una jeringa precargada. El vial de vidrio puede estar, p. ej., cerrado usando un tapón no recubierto o un tapón recubierto. El tapón puede ser, p. ej., un tapón de caucho o un tapón de bromobutilo. La jeringa, p. ej., una jeringa precargada, puede estar tapada con un émbolo de caucho o con un émbolo recubierto. El recubrimiento puede ser, p. ej., un recubrimiento de silicona exento de aceite.

[0079] Una jeringa precargada puede tener diferentes volúmenes tales como 0,5, 1, 1,5, o 2 ml. Preferiblemente, es una jeringa de 1 ml. El volumen de carga de la jeringa preferiblemente es 1 ó 1,2 ml. La jeringa precargada puede estar hecha de plástico o, preferiblemente, puede ser una jeringa de vidrio. Una jeringa de vidrio adecuada es, p. ej., la jeringa de vidrio Hypac 27G1/2 RNG W 7974/50G, fabricada por Becton Dickinson. La jeringa precargada puede estar preferiblemente tapada con un tapón recubierto (p. ej. W4023/50G, fabricado por FluroTec) y un émbolo no recubierto (p. ej. W4023/50G, fabricado por West Pharmaceutical). De acuerdo con la presente invención, la jeringa precargada preferiblemente comprende una cantidad de una proteína de fusión TACI-Ig en el intervalo de 20 a 160 mg, tal como por ejemplo 20, 25, 50, 75, 100, 125 ó 150 mg de fármaco. Como se muestra en el ejemplo 4 a continuación, una formulación de una proteína de fusión TACI-Ig a pH 5,0, que comprende tampón de acetato sódico y trealosa, era estable a lo largo de periodos de tiempo prolongados, p. ej., hasta 18 meses, cuando se mantenía a 5 ó 25°C.

[0080] El uso de valores numéricos en los diferentes intervalos especificados en esta solicitud, salvo que se indique expresamente lo contrario, se indican como aproximaciones como si los valores mínimos y máximos dentro de los intervalos indicados estuvieran ambos precedidos por la palabra "aproximadamente". De esta forma, se pueden usar ligeras variaciones por encima y por debajo de los intervalos indicados para lograr sustancialmente los mismos resultados que con los valores dentro de los intervalos. Además, la descripción de los intervalos se pretende que sea un intervalo continuo que incluye cada valor entre los valores mínimo y máximo citados así como cualquier intervalo que se pueda formar así.

[0081] En el contexto de la presente invención, la formulación o composición farmacéutica de la invención puede comprender o se puede administrar en combinación con otros principios activos además de una proteína de fusión

TACI-Ig. Por ejemplo, puede estar presente un corticoesteroide, en particular metilprednisolona. Además, interferón-beta, cladribina, mitoxantrona, acetato de glatiramer, natalizumab, rituximab, teriflunomida, fingolimod, laquinimod, o BG-12 (un fumarato oral). El tratamiento combinado puede ser simultáneo, separado o secuencial.

5 **[0082]** Habiendo ahora descrito completamente esta invención, los expertos en la materia apreciarán que se puede llevar a cabo la misma con un amplio intervalo de parámetros, concentraciones y condiciones equivalentes, sin salirse de la invención como se define en las reivindicaciones y sin excesiva experimentación.

10 **[0083]** Aunque esta invención se ha descrito en relación con sus realizaciones específicas, se entenderá que puede tener más modificaciones. Se pretende que esta solicitud cubra cualquier variación, uso o adaptación de la invención que siga en general los principios de la invención, e incluyendo dichas desviaciones de la presente descripción como vienen en la práctica conocida o habitual de la técnica a la que pertenece la invención y como se pueden aplicar a las características esenciales anteriores expuestas como sigue en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

15 **[0084]** La referencia a etapas de procedimientos conocidos, etapas de procedimientos convencionales, procedimientos conocidos o procedimientos convencionales, no es de ninguna forma la admisión de que cualquier aspecto, descripción o realización de la presente invención está descrita, enseñada o sugerida en la técnica relevante.

20 **[0085]** La descripción anterior de las realizaciones específicas pondrá así de manifiesto completamente la naturaleza general de la invención que otros, aplicando el conocimiento del experto en la materia (incluyendo los contenidos de las referencias citadas en el presente documento), pueden modificar y/o adaptar fácilmente para diferentes aplicaciones tales como realizaciones específicas, sin excesiva experimentación, sin desviarse del
25 concepto general de la presente invención, como se define en las reivindicaciones. Por lo tanto, dichas adaptaciones y modificaciones se pretende que estén dentro de un intervalo de equivalentes de las realizaciones descritas, basadas en la enseñanza y guía presentadas en el presente documento. Se entiende que las expresiones o terminología usados en el presente documento tienen el propósito de descripción y no de limitación, de modo que la terminología o las expresiones de la presente memoria descriptiva, el experto en la materia las debe interpretar a la
30 luz de las enseñanzas y guía presentados en el presente documento, en combinación con el conocimiento de un experto en la materia.

[0086] Habiendo descrito ahora la invención, se entenderá más fácilmente por referencia al siguiente ejemplo de un resumen de estudio clínico de ejemplo, que se proporciona a modo de ilustración, y no se pretende que sea
35 limitante de la presente invención.

EJEMPLO 1: DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN LÍQUIDA

GLOSARIO

40 **[0087]**
AUC: Ultracentrifugación analítica
DC: Dicroísmo circular
DLS: Dispersión de la luz dinámica
45 DSC: Calorimetría diferencial de barrido
IEC: Cromatografía de intercambio iónico
MALDI-ToF: Espectrometría de masas con ionización por desorción por láser asistida por matriz en tiempo de vuelo
DO: Densidad óptica
RALS: Dispersión de la luz en ángulo recto
50 RP: Cromatografía de fase inversa
SEC: Cromatografía por exclusión de tamaños

MATERIALES

55 **[0088]**
- Fármaco de TACI-Fc en tampón de fosfato a pH 6 + NaCl 140 mM
- Fármaco de TACI-Fc en tampón de fosfato a pH 5
- Fármaco de TACI-Fc en tampón de acetato a pH 5
- Ácido ortofosfórico (1.00563, Merck)

- Ácido succínico (1.00682, Merck)
- Ácido cítrico (1.59134, Merck)
- Histidina (1.04351, Merck)
- Ácido acético glacial al 100% (1.00063, Merck);
- 5 - D-Manitol DAB, Ph Eur, BP; USP, FCC, E421 (1.05980, Merck)
- D-Sorbitol (S-1876, Sigma)
- Sacarosa DAB, Ph Eur, BP, NF (1.07653, Merck)
- Trealosa (1.08216, Merck)
- D-Glucosa monohidrato (346971, Carlo Erba)
- 10 - Gránulos de hidróxido sódico GR (1.06498, Merck)
- Tween 20 para síntesis (8.22184, Merck);
- Poloxamer 188 (Lutrol F 68 DAC, USP/NF, Basf)
- Cloruro cálcico dihidrato (1.02382, Merck)
- Cloruro magnésico (1.05833, Merck)
- 15 - Cloruro sódico (1.06404, Merck)
- Hidrocloruro de arginina (A-5131, Sigma);
- Hidrocloruro de lisina (1.0571, Merck)
- Glicina (5.00190, Merck);
- Acetonitrilo (00030, Merck)
- 20 - 10xPBS (P/N 70013-032, Gibco)
- Ácido trifluoroacético (9470, Baker)
- Sulfato amónico (1.01217, Merck)
- Hidróxido sódico 1 N (1.09137, Merck)
- Ácido clorhídrico 1 N (1.09057, Merck)
- 25 - Agua de calidad para HPLC (MilliQ)
- Agua para inyección
- Sulfato sódico anhidro (código 6649, Merck)
- Metanol (código 06009, Merck)
- Azida sódica (código 6688, Merck)
- 30 - Dihidrogenofosfato sódico monohidrato (código 06346, Merck)
- Hidrogenofosfato disódico dihidrato (código 06580, Merck)

[0089] Para el bioensayo:

- 35 - células Jurkat pKZ142 clon 24 (WCB)
- TACI-Fc5 (1-8,66 mg/ml)
- zTNF4 (1,44 mg/ml)
- RPMI 1640 con y sin rojo de fenol (Gibco)
- Suero bovino fetal (FBS) (GIBCO)
- 40 - L-glutamina (Hyclone)
- Piruvato sódico (Gibco) Puromicina (Sigma)
- Sustrato y tampón de ensayo de luciferasa Steady GLO (ProMega. E251 0) Placas de cultivo tisular blancas de 96 pocillos con tapas (Dynex)
- Placas de 96 pocillos con cubiertas (Falcon)
- 45 - Tubos de polipropileno de 5 ml (Falcon)

EQUIPAMIENTO

[0090]

- 50 - Sistemas de HPLC (Waters)
- Pipetas calibradas (Gilson)
- Calorímetro diferencial de barrido (mod. 2920, TA Instruments)
- Microcalorímetro (mod. VP-DSC, MicroCal)
- Medidor de pH (mod. 713, Metrohm)
- 55 - Osmómetro (Osmomat 030-D, Gonotec)
- Espectropolarímetro J-810 equipado con un control Peltier para la temperatura, PTC-423S (Jasco)
- Espectrofluorómetro FluoroMax3 equipado con un lector de microplaca, MicroMax384 (Jobin Yvon)
- Placas de 96 pocillos MaxSorp (Nunc)
- Espectrofotómetro lambda 354 (Perkin Elmer)

- Cubetas de cuarzo de 0,1 y 1 cm de paso óptico (Perkin Elmer)
- Zetasizer Nano Series (Malvern)
- Cubetas de cuarzo de volumen reducido (~ 70 µl)
- Sistema celular agitado (mod. 8400 o 8450, Amicon)
- 5 - Membrana con corte de exclusión de 10 kDa (tipo YM10, Amicon)

[0091] Contenedores de acero inoxidable de 22 ml y 220 ml de capacidad (Sartorius)

- Filtros de membrana de 0,22 µm (Durapore tipo GWVP, Millipore)
- 10 - Filtros de membrana de 0,45 µm (Durapore tipo HVLP, Millipore)
- Espectrómetro de fluorescencia/RALS (Photon Technology International)
- Agitador VXR Vibrax IKA (IKA Works, Inc.)
- Liofilizadores (Lyoflex 06, Lyoflex 08, Edwards)
- Agitador Vortex (Falc)
- 15 - Armarios termostáticos (Heraeus)
- Congeladores (Angelantonì)

[0092] Para el bioensayo:

- 20 - Lector de placa luminómetro, Lumicount Packard
- Software Graph Pad Prism
- Campana de flujo laminar (Flow Laboratories)
- Incubador a 37°C y CO₂ (Heraeus)
- Baño de agua a 37°C
- 25 - Contador de células Coulter
- Microscopio
- Plataforma agitadora
- Centrífuga de sobremesa
- Pipetas de un canal y de múltiples canales calibradas y puntas de pipeta
- 30 - Ayuda de pipeta

MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO PRIMARIO

[0093]

- 35 - Viales de vidrio DIN2R (3 ml) (Nuova OMPI)
- Tapones de caucho Flurotec (S2F452, D777-1, B2-40, West Pharmaceutical)
- Tapones de caucho (1779 W1816 gris, Pharmagummi)

PROCEDIMIENTOS

40

Cromatografía de exclusión por tamaños (SEC)

Método 1

- 45 **[0094]** Las muestras se diluyeron hasta 0,5 mg/ml con PBS1X a pH = 7,2 y se cargaron 40 µl (20 µg) en una columna TSK-gel G3000SWXL 5 µm, 7,8 x 300 mm. Para cada experimento, el eluyente era fosfato sódico 0,05 M, sulfato amónico 0,5 M, pH = 6,0.

Método 2

50

- [0095]** Las muestras se diluyeron hasta 0,25 mg/ml en la fase móvil y se cargaron 40 µl (20 µg) en una columna TSK-gel G3000SWXL 5 µm, 7,8 x 300 mm, conectada a una precolumna TSK-gel SWXL de 6 mm x 4 cm. Para cada experimento, el eluyente era fosfato sódico 0,05 M, sulfato amónico 0,5 M, pH = 6,0.

55 Cromatografía de fase inversa (RP)

- [0096]** Las muestras se diluyeron hasta 0,5 mg/ml con PBS1X a pH = 7,2 y se cargaron 40 µl (20 µg) en una columna PLRP 4000 A 8 µm, 50 x 4,6 mm equilibrada en 71% de tampón A (TFA al 0,1% en agua) y 29% de tampón

B (TFA al 0,1% en acetonitrilo). Las muestras se eluyeron usando un gradiente lineal con un caudal de 2 ml/min. La curva de calibración se generó inyectando diferentes cantidades de la referencia (IRS TACI-Fc5 2002/2001).

Truncado del extremo C (RP)

5

[0097] Las muestras se sometieron a digestión enzimática (Lys-C) durante 2 h a 37°C y después se llevaron a la cromatografía en fase inversa en Vydac C18 (4,6 x 50 mm) con precolumna,

Eluyente A: TFA al 0,1% en agua

10 B: TFA al 0,08% en CH₃CN, 70%

Caudal: 1 ml/min

T: 40°±5°C

Detección: 214 nm

Gradiente de elución: de 15% de B a 23% en 7 min. Total 15 min

15

Formas enlazadas (RP)

[0098] Se diluyeron muestras de fármaco de TACI-Fc en agua purificada con el fin de obtener una concentración de proteína de 4 mg/ml. Después, 10 µl de la muestra diluida se diluyen en 200 µl de disolución de desnaturalización-reducción (DTT 0,15 M en guanidina 6 M), se mezclan con vórtice y finalmente se incuban a 60 ± 2°C durante 90 min. Se inyectan 75-150 µl (15-35 µg) en la columna (Wide-Pore Butyl, 5 mm, 4,6 mm de d.i. x 50 mm, código 7116-05 de J.T. Baker) previamente equilibrada con las condiciones iniciales (71% de eluyente A, ácido trifluoroacético al 0,05% en agua y 29% de eluyente B, ácido trifluoroacético al 0,04% en acetonitrilo).

25 Dímero Fc libre (IEC)

[0099] Se diluyeron muestras de fármaco de TACI-Fc en una disolución de Poloxamer 188 100 mg/ml en tampón de fosfato sódico 10 mM a pH 4,00, con el fin de obtener una concentración de proteína de 10 mg/ml. En el caso de una concentración de TACI-Fc mayor de 100 mg/ml, la dilución de las muestras debe llevarse a cabo por pesada.

30

[0100] Se inyectan 25 µl (250 µg) en la columna (ProPac WCX-10G (precolumna), 4 x 50 mm, código 054994 de Dionex) previamente equilibrada con las condiciones iniciales (80% de eluyente A, fosfato sódico 10 mM a pH 4,00 y 20% de eluyente B, fosfato sódico 10 mM a pH 4,00 + KCl 0,5 M).

35 Formas oxidadas (MALDI-ToF)

[0101] Se desarrolló la cartografía peptídica en las muestras de fármaco de TACI-Fc y se verificó la aplicabilidad de la detección por MALDI-ToF para la cuantificación de las formas oxidadas.

40 Ultracentrifugación analítica (AUC)

[0102] Las muestras se cargaron en celdas con piezas centrales de Epon-charcoal de 2 canales de 12 mm de paso óptico. Las muestras se diluyeron usando tampón de elución de SE-HPLC como diluyente para así imitar las condiciones del ensayo de HPLC. El correspondiente tampón se cargó en el canal de referencia (el instrumento funciona como un espectrofotómetro de doble haz). Las celdas cargadas después se pusieron en un rotor analítico AN-50Ti, se cargaron en una centrífuga analítica Beckman Optima XL-I. El análisis se llevó a cabo con los siguientes ajustes experimentales:

Tipo de rotos: rotor de 8 agujeros

50 Velocidad del rotor: 40K rpm

Piezas centrales: Epon-charcoal

Longitud del canal: 12 mm

Temperatura durante el experimento de AUC: 20°C ± 0,2°C

Longitud de onda de detección: 280 nm

55 Concentración de la muestra: 0,5 mg/ml

Volumen de muestra: 432 ml/canal

Volumen de referencia: 442 ml/canal

[0103] Los datos se analizaron usando el procedimiento c(s) desarrollado por Peter Schuck en el N.I.H. e

implementado en su programa de análisis SEDFIT (versión 8.7).

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

- 5 [0104] DSC 2920 CE de TA Instruments: Intervalo de T = 25-100°C; velocidad de calentamiento = 2°C/min; se cargaron cubetas de alto volumen (HVP) con 75 µl de disolución; se usaron placebos como disoluciones de referencia. Microcalorímetro MicroCal VP-DSC: Intervalo de T = 25-100°C; velocidad de calentamiento = 70 °C/h; respuesta = 15 s; separación de datos = 0,2-8°C; la celda de muestra se cargó con aproximadamente 600 µl de disolución de Taci-Fc5 5 mg/ml; se usó agua como disolución de referencia.

10

Densidad óptica (DO)

- [0105] Se prepararon disoluciones de TACI-Fc5 de 0,5 mg/ml (por dilución con agua) y sus concentraciones (c) se obtuvieron por la ecuación de Lambert-Beer: $DO = \epsilon b c$ (ϵ = coeficiente de extinción molar; b = grosor de la celda
15 óptica). ϵ (280 nm) = 1,56 (ml/mg).cm⁻¹. La concentración de las disoluciones iniciales se determinó multiplicando estos valores calculados por el factor de dilución.

Dicroísmo circular (DC)

20 *Análisis conformacional*

- [0106] El DC se usa habitualmente para estudiar la conformación de péptidos y proteínas. Varios factores pueden afectar al aspecto de los picos característicos en los espectros de DC, tanto en la región del UV lejano (180-250 nm) como del UV cercano (250-350 nm), tal como la concentración de proteína, temperatura, pH y concentración iónica.
25 Las posiciones de las bandas generales observadas en el UV lejano se describen en la bibliografía y representan tipos particulares de la estructura secundaria (hélice α , lámina β , espiral aleatoria). Las bandas de DC observadas en el intervalo de UV cercano se deben principalmente al Trp, Tyr, Phe y los enlaces disulfuro.

- [0107] Sin embargo, se debe señalar que la señal del enlace disulfuro en general es mucho más débil que la de
30 los aminoácidos aromáticos. Siempre que estos restos estén en un entorno asimétrico, se puede proporcionar una señal de DC. Los cambios conformacionales en la estructura terciaria de la proteína normalmente conducen a variaciones del entorno inicial produciendo así una modificación en el espectro de DC. De hecho, en una proteína natural los aminoácidos individuales ocupan posiciones únicas dentro de la estructura tridimensional. Las alteraciones en esta estructura podrían conducir a un cambio en su accesibilidad.

35

Ajustes de los espectros de DC en el UV cercano

- [0108] Velocidad de barrido 5-20 nm/min; intervalo = 250-350 nm; respuesta = 8 s; concentración = 2 mg/ml; paso
40 óptico = 1 cm; separación de datos = 0,5 nm; anchura de banda = 1 nm; acumulaciones = 2. Sensibilidad estándar. Los espectros se adquirieron a temperatura ambiente.

Ajustes de los espectros de DC en el UV lejano

- [0109] Velocidad de barrido 5-20 nm/min; intervalo = 200-300 nm; respuesta = 8 s; concentración = 0,25 mg/ml;
45 paso óptico = 0,1 cm; separación de datos = 0,5 nm; anchura de banda = 1 nm; acumulaciones = 2. Sensibilidad estándar. Los espectros se adquirieron a temperatura ambiente.

Temperaturas de desplegamiento

- 50 [0110] Los barridos de temperatura controlados por DC a una longitud de onda fija son una herramienta valiosa para investigar tanto la estructura secundaria como la terciaria de la proteína a diferentes temperaturas. Dicha medición permite evaluar la temperatura de desplegamiento de la proteína (T_{desp}) en diferentes formulaciones. Aunque la T_{desp} no tiene una relación directa con la energía libre del desplegamiento de la proteína (que es un indicador de la estabilidad de la proteína), está ampliamente aceptado que cualquier aumento de la T_{desp} debería correlacionarse
55 con un aumento en la estabilidad de la proteína. Por lo tanto, un cambio en la T_m puede indicar si una composición particular tiene cualquier efecto estabilizante o desestabilizante. La desnaturalización térmica se investigó controlando la variación de la señal del Trp (triptófano) asociada con el cambio conformacional de la proteína con la temperatura. Las formulaciones de fármaco se sometieron a un calentamiento (1°C/min) en el intervalo de 55-70°C. El efecto de la temperatura en la estructura terciaria se detectó por cambios en la elipticidad del DC con respecto al

mínimo a 292,5 nm. Se usaron ajustes polinomiales de cuarto grado para calcular los valores de las temperaturas de transición.

Ajustes del barrido de temperatura del DC

5

[0111] Intervalo de T = 55-70°C; velocidad de calentamiento = 1°C/min; λ = 292,5 nm; concentración = 2 mg/ml; respuesta = 8 s; separación de datos = 0,2-8°C; anchura de banda = 1,5 nm. Sensibilidad estándar. Velocidad de agitación = baja.

10 Dispersión de luz dinámica (DLS)

[0112] La dispersión de luz dinámica mide la dispersión inducida por el *movimiento Browniano* de las partículas y se relaciona con el tamaño de las partículas. Requiere someter las partículas a un haz láser y analizar las fluctuaciones de la intensidad en la luz dispersada. Más precisamente, la velocidad de las partículas que se mueven debido al *movimiento Browniano* está relacionado con el tamaño de las partículas (ecuación de Stokes-Einstein). El correlador digital mide el grado de similitud entre dos señales (*intensidad* de las señales en este caso) a lo largo de un periodo de tiempo y da información relacionada con la naturaleza y la extensión de las fluctuaciones de la intensidad de la dispersión, que están relacionadas con las dimensiones de las partículas. Después de determinar la función de correlación, entonces se puede usar para calcular la distribución de tamaños.

20

[0113] El Zetasizer Nano Series mide la intensidad de la dispersión cercana a 180°C (*detección de retrodispersión*). Dicha configuración reduce el efecto de la dispersión múltiple a través de la muestra y el efecto de los contaminantes grandes. Se usó la cubeta de calibrado desechable (volumen interno ~70 μ l). Las mediciones se llevaron a cabo a T = 25°C. Tiempo de equilibrado = 1 min; número de experimentos = 11; duración del experimento = 10 s; número de mediciones = 2. Dispersante: agua (viscosidad = 0,8872 cP; índice de refracción = 1,330). No se hicieron diluciones.

25

Dispersión de la luz en ángulo recto (RALS) usando fluorescencia

[0114] La RALS se mide usando un detector de fluorescencia en el que las longitudes de onda de excitación y emisión se han ajustado de forma idéntica. En esta configuración, el detector de fluorescencia se convierte en un detector de RALS muy sensible. Los aumentos de RALS son indicativos de agregación/precipitación en la muestra.

30

Fluorescencia

35

Fluorescencia intrínseca

[0115] Las proteínas contienen tres restos de aminoácidos aromáticos (triptófano: Trp; tirosina: Tyr; fenilalanina: Phe), que pueden contribuir a su fluorescencia intrínseca. La fluorescencia de una proteína plegada es una combinación de la fluorescencia de los restos aromáticos individuales. La fluorescencia de la proteína en general se excita a 280 nm o longitudes de onda mayores, normalmente a 295 nm. La mayoría de las emisiones se deben a la excitación de los restos de triptófano, con unas pocas emisiones debidas a la tirosina y la fenilalanina. La intensidad, rendimiento cuántico y longitud de onda de la emisión de fluorescencia máxima del triptófano es muy dependiente del disolvente. El espectro de fluorescencia se desplaza a longitud de onda más corta y la intensidad de la fluorescencia aumenta al disminuir la polaridad del disolvente alrededor de los restos de triptófano. Los restos de triptófano, que están enterrados en el centro hidrófobo de las proteínas, pueden tener espectros que están desplazados de 10 a 20 nm comparado con los triptófanos en la superficie de la proteína. Además, la fluorescencia del triptófano se puede atenuar mediante grupos ácidos protonados cercanos tales como Asp o Glu. Por lo tanto, la fluorescencia se puede usar como una herramienta de control poderosa, que refleja las variaciones en el microentorno en el que están los restos aromáticos.

40

45

50

[0116] El MicroMax 384 es un lector de placa de micropocillos que puede aceptar placas con hasta 384 pocillos y conecta con el espectrofluorómetro FluoroMax. La luz de los monocromadores de excitación y emisión se lleva por un haz de fibra óptica a y desde el MicroMax 384, de esta forma, el usuario puede hacer el barrido con el espectrofluorómetro principal y seleccionar cualquier pareja de longitudes de onda de excitación y emisión para las mediciones de la intensidad. Todo el control del MicroMax 384 es automático mediante el software DataMax; es posible la selección por el usuario de los micropocillos en la placa mediante el software.

55

[0117] Los barridos de fluorescencia de alto rendimiento se llevaron a cabo usando el lector de placa MicroMax

384 usando los siguientes ajustes: rendijas de excitación y emisión = 5 nm; λ_{exc} = 280 nm; intervalo de emisión = 300-450 nm; tiempo de integración = 0,1 s. No se hizo dilución. La longitud de onda de emisión máxima se calculó automáticamente mediante el software Fluoromax 3.

5 RALS

[0118] Las mediciones de RALS se llevan a cabo realizando barridos sincrónicos ($\lambda_{exc} = \lambda_{em}$) con el espectrofluorímetro FluoroMax entre 500-800 nm. En estas condiciones (no hay absorción por la muestra ni influencia por la fuente de luz) la intensidad manifestada se debe principalmente al fenómeno de dispersión (luz
10 incidente/proteína) que se produce en disolución. La intensidad dispersada total aumenta al aumentar las dimensiones de la proteína, y por lo tanto esta técnica puede ser útil para controlar la aparición de sucesos tales como la agregación, disociación de subunidades, degradaciones, etc.

[0119] La intensidad de la dispersión también depende de la concentración de proteína y del índice de refracción,
15 de modo que se deben llevar a cabo mediciones comparativas con la misma concentración de proteína.

[0120] Las mediciones de RALS se llevaron a cabo ajustando los siguientes parámetros; barrido sincrónico; intervalo de longitud de onda = 500-800 nm; rendijas = 15 nm; tiempo de integración = 0,5 s; desplazamiento = 0 nm; concentración de la muestra = 35 mg/ml (se usó agua milliQ como diluyente).
20

Anisotropía de la emisión de fluorescencia

[0121] La rotación de las macromoléculas depende de su tamaño, forma y entorno local (es decir, disolvente). Las mediciones de emisión polarizada a menudo se usan para detectar pequeños cambios en el tamaño molecular
25 (agregación, unión, escisión) así como cambios en el entorno (viscosidad local, transiciones de fase, etc.). La primera etapa en estas mediciones es la excitación de un grupo seleccionado de fluoróforos (*fotoselección*). Típicamente se usa luz polarizada en dirección vertical para excitar una población de moléculas cuyo dipolo de absorción está orientado en la dirección vertical. En esta fase, la luz de excitación polarizada en dirección vertical se produce usando un polarizador en el camino de excitación. Una vez excitada, la molécula puede rotar durante el
30 tiempo de vida del estado excitado ($\sim 10^{-9}$ s). Dicha *rotación* despolarizará la emisión de fluorescencia. Las mediciones de los componentes de *emisión* polarizados permiten el cálculo del tipo y extensión de los movimientos rotacionales de la molécula. Los componentes polarizados de la emisión de fluorescencia se miden usando un polarizador en el camino de emisión. A partir de la magnitud de los componentes de emisión vertical (V) y horizontal (H), se puede calcular el tipo y extensión de comportamiento rotacional. La *anisotropía* (A) es una relación definida
35 como la diferencia entre la intensidad de los componentes polarizados linealmente dividido entre la intensidad de la luz total:

$$A = (I_{VV} - G \cdot I_{VH}) / (I_{VV} + 2G \cdot I_{VH})$$

40 donde:

G es un factor de corrección, $G = I_{HV} / I_{HH}$

[0122] En estas ecuaciones, el primer subíndice de la intensidad I indica la posición del polarizador de excitación (H o V) y el segundo del polarizador de emisión (H o V). La anisotropía de la fluorescencia, cuando la longitud de
45 onda de excitación se ajusta a $\lambda = 295$ nm, da información relacionada con la movilidad de los restos de Trp y de la viscosidad local que experimentan. Por lo tanto, un aumento de la anisotropía de la fluorescencia puede reflejar un entorno más rígido de estos restos en las proteínas.

[0123] Las mediciones de anisotropía se llevaron a cabo ajustando los siguiente parámetros: λ_{exc} = 295 nm; intervalo de emisión = 300-350 nm; tiempo de integración = 0,5 s; rendijas = 15 nm; concentración de la muestra = 35 mg/ml (se usó agua milliQ como diluyente).
50

Bioensayo

55 [0124] El bioensayo in vitro de TACI-Fc se basa en células transfectadas Jurkat (linfocitos T agudos humanos) (Jurkat pKZ142). Esta línea celular se ha transfectado con 2 plásmidos. El primero codifica el ADNc de TACI de longitud entera bajo el control del promotor de CMV y el segundo con NF- κ B/AP-1 que dirige un gen indicador de luciferasa. El procedimiento se basa en la capacidad de zTNF4 para unirse al receptor TACI de superficie celular, desencadenando una cascada de transducción de señales, que produce la estimulación del gen indicador de

luciferasa NF-kB/AP-1 transfectado. La presencia de TACI-Fc soluble inhibe la unión de zTNF4 al receptor TACI, reduciendo de esta forma la expresión de la luciferasa.

5 **[0125]** Las células Jurkat pKZ142 se incubaron con TACI-Fc de referencia para construir una curva de dosis-respuesta completa (de 27,86 a 1,63 U/ml) y con muestras ensayadas en dos concentraciones situadas en la parte lineal de la curva de referencia (es decir, 4 y 6 U/ml).

10 **[0126]** Después se añade la disolución de zTNF4 tanto a la curva de referencia como a las muestras en una concentración que sea capaz de inducir la producción submáxima de luciferasa (es decir, 150 ng/ml/pocillo); también se lleva a cabo como control la producción mínima y máxima de luciferasa. Después de 4 h de incubación a 37°C (5% de CO₂), se añade a las células el kit de luciferasa Steady Go y se detecta la expresión de luciferasa mediante un luminómetro.

15 **[0127]** La potencia de las muestras se calcula por interpolación de los valores Y (URL) para las dos concentraciones ensayadas en la parte lineal de la curva de dosis-respuesta de referencia, consiguiendo así la concentración de TACI-Fc en el eje X (software Graph Pad). Los valores de las dos concentraciones de ensayos independientes se promedian y después se calcula la actividad biológica de TACI-Fc5 llevando a cabo la media aritmética de la potencia obtenida de cada ensayo independiente.

20 PROCEDIMIENTO DE PREFORMULACIÓN

[0128] Se evaluó el efecto del pH, tipo de tampón y excipientes en la estabilidad de la proteína. Se prepararon disoluciones de TACI-Fc con una concentración de 70 ó 100 mg/ml para investigar preliminarmente las siguientes variables:

- pH (4, 5, 6, 7)
- tampón (acetato, fosfato, succinato, citrato, histidina)
- azúcares (manitol, sorbitol, glucosa, sacarosa, trealosa)
- excipientes (cloruro sódico, cloruro magnésico, cloruro cálcico, glicina)

30 **[0129]** Además de esto, se llevaron a cabo los siguientes estudios de precribado de TACI-Fc5 con 70 mg/ml:

- Ciclos de congelación-descongelación (F-T) (1, 3, 5 F-T) en tampón 20 mM (histidina, fosfato, succinato, citrato) a pH 5-6-7;
- 35 - incubación a 40°C (condiciones con agitación y sin agitación);
- almacenamiento a 2-8°C en tampón 20 mM (acetato, histidina, fosfato) a pH 4-5-6.

40 **[0130]** Basándose en los resultados procedentes de estas primeras observaciones, se seleccionaron dos tampones (fosfato e histidina) a pH 5 y 6 y un segundo conjunto de formulaciones preparadas para investigar el efecto de la inclusión de agentes estabilizantes adicionales (a 0,280 OSM de osmolalidad residual). Se ensayaron los siguientes agentes estabilizantes: glucosa, manitol, sorbitol, sacarosa, trealosa, glicina, NaCl, MgCl₂, CaCl₂.

45 **[0131]** Las disoluciones se almacenaron a 2-8°C, 25°C y 40°C y se ensayaron hasta 14 días los agregados (SE-HPLC), contenido de proteína (RP-HPLC), pH y aspecto.

55 DISEÑO EXPERIMENTAL

50 **[0132]** Basándose en la selección hecha durante la fase previa, se preparó un diseño experimental para evaluar la influencia de los factores investigados previamente en diferentes niveles en relación con la estabilidad de la proteína. Se ensayaron formulaciones en tampones de acetato e histidina junto con los siguientes tensioactivos: Poloxamer 188 (Lutrol® F-68) y Tween 20, y con los siguientes excipientes: arginina, glicina, lisina, manitol y trealosa. Estas formulaciones se almacenaron en viales de vidrio a 2-8°C, 25° y 40°C y se ensayaron los agregados (por SE-HPLC y AUC), pH, aspecto y osmolalidad. También se aplicaron procedimientos analíticos biofísicos (p. ej., dicroísmo circular, espectroscopía de 2ª derivada UV, fluorescencia intrínseca).

FORMULACIONES CANDIDATAS

[0133] Al final de la fase de preformulación, se identificaron algunas formulaciones candidatas que contenían TACI-Gc 70 ó 100 mg/ml, tampón acetato 10 mM, manitol (51 mg/ml) o trealosa anhidra (80 ó 96 mg/ml) como

excipiente, con o sin Poloxamer 188 (Lutrol® F-68) (0,05 mg/ml). Se ensayaron valores de pH de 4,8, 5,0, 5,2 y 5,4.

[0134] Todas las disoluciones se filtraron de forma aseptica a través de una membrana Durapore de 0,22 µm y se recogieron en un recipiente esterilizado. Después, las disoluciones se cargaron en viales de vidrio DIN2R (volumen de carga de 1 ml). Se tomaron muestras durante el procedimiento (antes y después de la filtración) durante la fabricación para evaluar la pérdida de proteína o aumento de agregación.

[0135] Las muestras se almacenaron a 2-8°C, 25° y 40°C y se ensayaron hasta 1 mes (40°C) y 6 meses (2-8°C, 25°C).

10

[0136] Se ensayaron en las formulaciones candidatas los agregados (SE-HPLC, AUC), contenido de proteína (SE-HPLC), pH, osmolalidad y actividad biológica. También se determinó la extensión del truncado del extremo C y el porcentaje de formas truncadas/enlazadas. También se aplicaron procedimientos biofísicos (fluorescencia intrínseca, dispersión de luz dinámica, dispersión de luz a 90°).

15

[0137] También se evaluó el efecto de congelación-descongelación de las muestras líquidas de las formulaciones candidatas almacenadas a 2-8°C: las muestras se congelaron a -80°C y después se descongelaron a temperatura ambiente. Se evaluó la cantidad de agregados antes y después de la congelación-descongelación por SE-HPLC.

20 **[0138]** Se evaluó el efecto de agitación 24 h para simular el transporte del fármaco en las muestras almacenadas a 2-8°C, que se pusieron en agitación en un agitador de microplaca a temperatura ambiente durante 24 h. Se evaluó el nivel de agregados por SE-HPLC frente al nivel inicial.

RESULTADOS

25

[0139] Las formulaciones candidatas estaban en acetato-Na 10 mM

Formulación nº	TACI-Fc (mg/ml)	Composición
21A	70	pH 5, trealosa 96 mg/ml, Poloxamer 188 0,05 mg/ml (Lutrol® F-68)
21B	70	pH 5, trealosa 80 mg/ml
21C	70	pH 5,4, trealosa 80 mg/ml, Poloxamer 188 0,05 mg/ml (Lutrol® F-68)
21D	100	pH 5, trealosa 80 mg/ml, Poloxamer 188 0,05 mg/ml (Lutrol® F-68)
21E	100	pH 5, trealosa 80 mg/ml
21F	100	pH 5,4, trealosa 80 mg/ml, Poloxamer 188 0,05 mg/ml (Lutrol® F-68)
21G	100	pH 5, manitol 51 mg/ml, Poloxamer 188 0,05 mg/ml (Lutrol® F-68)
21H	100	pH 5, manitol 51 mg/ml
21I	100	pH 4,8, trealosa 80 mg/ml, Poloxamer 188 0,05 mg/ml (Lutrol® F-68)
21L	100	pH 5,2, trealosa 80 mg/ml, Poloxamer 188 0,05 mg/ml (Lutrol® F-68)

[0140] Los resultados detallados se dan en las siguientes tablas A a T.

30

Tabla A: % de agregados totales por SE-HPLC (2-8°C)

	TACI-Fc5 (mg/ml)	Composición	tiempo 0	4 sem.	6 sem.	8 sem.	12 sem.	16 sem.	26 sem.
21A	70	pH 5, Tre 96 mg/ml, F68 0,05	3,3	3,6	3,7	3,2	2,9	-	2,0
21B	70	pH 5, Tre 80 mg/ml	3,4	3,7	3,8	3,5	3,0	-	2,1
21C	70	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	3,4	3,6	3,8	3,9	3,1		2,2
21D	100	pH 5, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	3,4	3,6	3,9	3,5	3,0	-	2,3
21E	100	pH 5, Tre 80 mg/ml	3,7	4,5	3,8	3,8	3,3	-	2,3
21F	100	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	3,6	3,7	3,9	3,4	3,4		2,8
21G	100	pH 5, Man 51 mg/ml, F68 0,05	3,7	3,7	3,9	4,1	3,2	-	2,6
21H	100	pH 5, Man 51 mg/ml	3,8	3,7	4,1	3,6	3,3	-	2,6
21I	100	pH 4,8, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	3,6	3,3	2,9	3,0	-	2,6	-
21L	100	pH 5,2, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	3,6	3,4	3,3	3,3	-	2,7	-

Carga usada: S128 / L20a (tampón de acetato sódico 10 mM, pH = 5,0). % de agregados totales = 3,9

Tabla B: % de agregados totales por SE-HPLC (25°C)

	TACI-Fc5 (mg/ml)	Composición	tiempo 0	2 sem.	4 sem.	6 sem.	8 sem.	12 sem.	17 sem.	27 sem.
21A	70	pH 5, Tre 96 mg/ml, F68 0,05	3,3	2,6	4,0	3,8	3,7	3,5	-	3,4
21B	70	pH 5, Tre 80 mg/ml	3,4	3,0	3,7	4,1	3,9	3,4	-	3,5
21C	70	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	3,4	3,1	3,9	4,2	4,6	4,0		4,5
21D	100	pH 5, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	3,4	5,0	4,0	4,1	4,4	4,2	-	4,4
21E	100	pH 5, Tre 80 mg/ml	3,7	3,3	3,9	4,6	4,5	4,4	-	4,7
21F	100	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	3,6	3,8	4,5	5,0	5,1	5,2		6,5
21G	100	pH 5, Man 51 mg/ml, F68 0,05	3,7	3,9	3,9	4,7	4,7	4,5	-	4,9
21H	100	pH 5, Man 51 mg/ml	3,8	3,4	3,9	4,6	4,5	4,4	-	4,9
21I	100	pH 4,8, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	3,6	3,0	3,6	3,3	3,5	-	5,0	-
21L	100	pH 5,2, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	3,6	3,4	4,1	3,8	4,2	-	4,9	-

Carga usada: S128 / L20a (tampón de acetato sódico 10 mM, pH = 5,0). % de agregados totales = 3,9

5 Tabla C: % de agregados totales por SE-HPLC (40°C)

	TACI-Fc5 (mg/ml)	Composición	tiempo 0	1 sem.	2 sem.	4 sem.
21A	70	pH 5, Tre 96 mg/ml, F68 0,05	3,3	3,9	4,1	6,1
21B	70	pH 5, Tre 80 mg/ml	3,4	4,0	4,4	6,3
21C	70	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	3,4	4,4	5,3	7,4
21D	100	pH 5, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	3,4	5,0	5,3	7,9
21E	100	pH 5, Tre 80 mg/ml	3,7	5,0	5,5	7,9
21F	100	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	3,6	6,2	7,4	11,0
21G	100	pH 5, Man 51 mg/ml, F68 0,05	3,7	5,0	6,1	8,4
21H	100	pH 5, Man 51 mg/ml	3,8	5,9	6,1	8,4
21I	100	pH 4,8, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	3,6	6,1	7,4	12,2
21L	100	pH 5,2, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	3,6	7,6	8,9	14,0

Carga usada: S128 / L20a (tampón de acetato sódico 10 mM, pH = 5,0). % de agregados totales = 3,9

Tabla D: % de dímeros por AUC (2-8°C)

	TACI-Fc5 (mg/ml)	Composición	4 sem.	8 sem.	13 sem.
21A	70	pH 5, Tre 96 mg/ml, F68 0,05	4,0	7,4	3,0
21B	70	pH 5, Tre 80 mg/ml	3,2	1,6	3,6
21C	70	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	-	7,5	2,6
21D	100	pH 5, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	-	4,2	3,7
21E	100	pH 5, Tre 80 mg/ml	3,3	4,5	3,2
21F	100	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	4,0	2,9	4,1
21G	100	pH 5, Man 51 mg/ml, F68 0,05	3,1	4,0	3,1
21H	100	pH 5, Man 51 mg/ml	3,7	4,7	2,8
21I	100	pH 4,8, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	3,9	-	-
21L	100	pH 5,2, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	3,5	-	-

Tabla E: % de agregados grandes por AUC (2-8°C)

	TACI-Fc5 (mg/ml)	Composición	4 sem.	8 sem.	13 sem.
21A	70	pH 5, Tre 96 mg/ml, F68 0,05	2,3	2,8	1,1
21B	70	pH 5, Tre 80 mg/ml	2,0	0,5	2,5
21C	70	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	-	3,0	0,6
21D	100	pH 5, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	-	2,1	1,4
21E	100	pH 5, Tre 80 mg/ml	1,2	1,5	1,2
21F	100	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	1,1	0,8	1,6
21G	100	pH 5, Man 51 mg/ml, F68 0,05	1,5	2,1	1,5
21H	100	pH 5, Man 51 mg/ml	1,9	2,1	1,3
21I	100	pH 4,8, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	1,9	-	-
21L	100	pH 5,2, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	2,0	-	-

5

Tabla F: % de dímeros por AUC (25°C)

	TACI-Fc5 (mg/ml)	Composición	T=0 (4 sem. 5°C)	4 sem.	8 sem.	13 sem.
21A	70	pH 5, Tre 96 mg/ml, F68 0,05	4,0	2,6	3,8	5,3
21B	70	pH 5, Tre 80 mg/ml	3,2	3,9	3,4	2,7
21C	70	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	-	2,8	4,0	5,6
21D	100	pH 5, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	-	2,4	4,2	3,2
21E	100	pH 5, Tre 80 mg/ml	3,3	3,3	3,7	3,7
21F	100	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	4,0	4,3	5,2	4,2
21G	100	pH 5, Man 51 mg/ml, F68 0,05	3,1	3,9	3,9	3,8
21H	100	pH 5, Man 51 mg/ml	3,7	3,0	4,3	6,6
21I	100	pH 4,8, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	3,9	-	-	-
21L	100	pH 5,2, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	3,5	-	-	-

Tabla G: % de agregados grandes por AUC (25°C)

	TACI-Fc5 (mg/ml)	Composición	T=0 (4 sem. 5°C)	4 sem.	8 sem.	13 sem.
21A	70	pH 5, Tre 96 mg/ml, F68 0,05	2,3	0,3	0,8	2,5
21B	70	pH 5, Tre 80 mg/ml	2,0	1,1	0,6	0,2
21C	70	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	-	0,1	0,8	1,3
21D	100	pH 5, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	-	0,4	1,3	0,2
21E	100	pH 5, Tre 80 mg/ml	1,2	0,9	0,9	0,9
21F	100	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	1,1	1,6	1,2	0,7
21G	100	pH 5, Man 51 mg/ml, F68 0,05	1,5	1,9	1,1	1,1
21H	100	pH 5, Man 51 mg/ml	1,9	1,5	2,6	3,6
21I	100	pH 4,8, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	1,9	-	-	-
21L	100	pH 5,2, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	2,0	-	-	-

Tabla H: % de dímeros por AUC (40°C)

	TACI-Fc5 (mg/ml)	Composición	T=0 (4 sem. 5°C)	2 sem.	3 sem.
21A	70	pH 5, Tre 96 mg/ml, F68 0,05	4,0	-	4,4
21B	70	pH 5, Tre 80 mg/ml	3,2	-	3,9
21C	70	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	-	-	5,3
21D	100	pH 5, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	-	-	-
21E	100	pH 5, Tre 80 mg/ml	3,3	-	6,4
21F	100	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	4,0	-	7,0
21G	100	pH 5, Man 51 mg/ml, F68 0,05	3,1	-	6,0
21H	100	pH 5, Man 51 mg/ml	3,7	-	6,4
21I	100	pH 4,8, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	3,9	4,9	-
21L	100	pH 5,2, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	3,5	8,0	-

Tabla I: % de agregados grandes por AUC (40°C)

	TACI-Fc5 (mg/ml)	Composición	T=0 (4 sem. 5°C)	2 sem.	3 sem.
21A	70	pH 5, Tre 96 mg/ml, F68 0,05	2,3	-	1,8
21B	70	pH 5, Tre 80 mg/ml	2,0	-	1,5
21C	70	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	-	-	2,0
21D	100	pH 5, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	-	-	-
21E	100	pH 5, Tre 80 mg/ml	1,2	-	2,8
21F	100	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	1,1	-	2,6
21G	100	pH 5, Man 51 mg/ml, F68 0,05	1,5	-	3,0
21H	100	pH 5, Man 51 mg/ml	1,9	-	3,9
21I	100	pH 4,8, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	1,9	5,8	-
21L	100	pH 5,2, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	2,0	4,6	-

5 Tabla J: Contenido de proteína por SE-HPLC (2-8°C)

	TACI-Fc5 (mg/ml)	Composición	tiempo 0	4 sem.	6 sem.	8 sem.	12 sem.	16 sem.	26 sem.
21A	70	pH 5, Tre 96 mg/ml, F68 0,05	64,7	64,2	66,3	63,2	66,9		66,0
21B	70	pH 5, Tre 80 mg/ml	69,8	62,2	67,3	62,1	67,6		63,1
21C	70	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	62,1	64,7	66,4	63,7	65,7		64,4
21D	100	pH 5, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	90,7	91,5	91,8	89,1	96,8		92,5
21E	100	pH 5, Tre 80 mg/ml	92,6	97,7	99,8	87,7	92,9		92,4
21F	100	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	96,1	91,8	94,3	90,4	92,8		93,5
21G	100	pH 5, Man 51 mg/ml, F68 0,05	94,7	100,4	95,7	91,2	93,3		90,4
21H	100	pH 5, Man 51 mg/ml	89,0	98,6	90,6	89,0	93,3		88,8
21I	100	pH 4,8, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	94,3	99,5	88,8	100,0		91,5	
21L	100	pH 5,2, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	96,9	85,2	93,3	99,6		98,2	

Tabla K: Contenido de proteína por SE-HPLC (25°C)

	TACI-Fc5 (mg/ml)	Composición	tiempo 0	2 sem.	4 sem.	6 sem.	8 sem.	12 sem.	17 sem.	27 sem.
21A	70	pH 5, Tre 96 mg/ml, F68 0,05	64,7	61,6	66,8	67,5	65,3	68,3	63,3	63,3
21B	70	pH 5, Tre 80 mg/ml	69,8	60,0	63,2	66,1	63,4	64,7		62,7
21C	70	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	62,1	59,0	64,1	66,8	64,5	64,4		62,9
21D	100	pH 5, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	90,7	99,5	89,6	94,9	91,6	94,3		89,4
21E	100	pH 5, Tre 80 mg/ml	92,6	85,0	91,0	98,0	92,0	95,6		82,1
21F	100	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	96,1	n.v.	90,9	96,0	94,5	94,4		91,1
21G	100	pH 5, Man 51 mg/ml, F68 0,05	94,7	88,4	96,1	92,7	105,0	93,5		87,8
21H	100	pH 5, Man 51 mg/ml	89,0	88,4	94,4	94,7	89,9	91,3		88,5
21I	100	pH 4,8, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	94,3	95,3	97,8	89,7	98,6		95,2	
21L	100	pH 5,2, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	96,9	100,0	100,1	92,7	103,0		92,7	

Tabla L: Contenido de proteína por SE-HPLC (40°C)

	TACI-Fc5 (mg/ml)	Composición	tiempo 0	1 sem.	2 sem.	4 sem.
21A	70	pH 5, Tre 96 mg/ml, F68 0,05	64,7	64,9	60,9	67,1
21B	70	pH 5, Tre 80 mg/ml	69,8	64,5	59,8	66,9
21C	70	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	62,1	63,8	61,2	65,2
21D	100	pH 5, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	90,7	89,3	85,7	91,4
21E	100	pH 5, Tre 80 mg/ml	92,6	90,5	86,2	88,6
21F	100	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	96,1	93,5	85,1	90,7
21G	100	pH 5, Man 51 mg/ml, F68 0,05	94,7	88,6	85,6	97,8
21H	100	pH 5, Man 51 mg/ml	89,0	93,0	83,9	96,5
21I	100	pH 4,8, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	94,3	92,0	91,2	99,7
21L	100	pH 5,2, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	96,9	97,1	94,9	103,3

5 Tabla M: Valores de pH (2-8°C)

	TACI-Fc5 (mg/ml)	Composición	tiempo 0	4 sem.	6 sem.	8 sem.	12 sem.	16 sem.	26 sem.
21A	70	pH 5, Tre 96 mg/ml, F68 0,05	5,2	5,1	5,1	5,1	5,1	-	5,1
21B	70	pH 5, Tre 80 mg/ml	5,2	5,1	5,1	5,1	5,1	-	5,1
21C	70	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	5,4	5,3	5,3	5,3	5,3		5,3
21D	100	pH 5, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	5,1	5,0	5,0	5,0	5,0	-	5,0
21E	100	pH 5, Tre 80 mg/ml	5,1	5,0	5,1	5,0	5,1	-	5,1
21F	100	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	5,5	5,4	5,4	5,4	5,3		5,4
21G	100	pH 5, Man 51 mg/ml, F68 0,05	5,2	5,1	5,1	5,1	5,1	-	5,1
21H	100	pH 5, Man 51 mg/ml	5,2	5,1	5,1	5,1	5,1	-	5,1
21I	100	pH 4,8, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	4,8	4,8	4,9	4,8	-	4,8	-
21L	100	pH 5,2, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	5,2	5,2	5,3	5,2	-	5,2	-

Tabla N: Valores de pH (25°C)

	TACI- Fc5 (mg/ ml)	Composición	tiempo 0	2 sem.	4 sem.	6 sem.	8 sem.	12 sem.	17 sem.	27 sem.
21A	70	pH 5, Tre 96 mg/ml, F68 0,05	5,2	5,2	5,1	5,1	5,0	5,1	-	5,1
21B	70	pH 5, Tre 80 mg/ml	5,2	5,1	5,0	5,1	5,0	5,1	-	5,1
21C	70	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	5,4	5,4	5,3	5,3	5,3	5,4	-	5,3
21D	100	pH 5, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	5,1	5,0	5,0	5,0	5,1	5,1	-	5,0
21E	100	pH 5, Tre 80 mg/ml	5,1	5,1	5,0	5,1	5,0	5,1	-	5,0
21F	100	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	5,5	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4		5,3
21G	100	pH 5, Man 51 mg/ml, F68 0,05	5,2	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	-	5,1
21H	100	pH 5, Man 51 mg/ml	5,2	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	-	5,1
21I	100	pH 4,8, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	4,8	4,8	4,8	4,9	4,9	-	4,9	-
21L	100	pH 5,2, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	5,2	5,3	5,2	5,2	5,3	-	5,2	-

Tabla O: Valores de pH (40°C)

	TACI-Fc5 (mg/ml)	Composición	tiempo 0	1 sem.	2 sem.	4 sem.
21A	70	pH 5, Tre 96 mg/ml, F68 0,05	5,2	5,1	5,2	5,1
21B	70	pH 5, Tre 80 mg/ml	5,2	5,1	5,1	5,1
21C	70	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	5,4	5,4	5,4	5,4
21D	100	pH 5, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	5,1	5,0	5,1	5,0
21E	100	pH 5, Tre 80 mg/ml	5,1	5,1	5,1	5,0
21F	100	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	5,5	5,4	5,4	5,4
21G	100	pH 5, Man 51 mg/ml, F68 0,05	5,2	5,1	5,1	5,1
21H	100	pH 5, Man 51 mg/ml	5,2	5,1	5,1	5,1
21I	100	pH 4,8, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	4,8	4,9	4,9	4,9
21L	100	pH 5,2, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	5,2	5,3	5,3	5,3

5 Tabla P: Osmolalidad (osm/kg)

	TACI-Fc5 (mg/ml)	Composición	T=0
21A	70	pH 5, Tre 96 mg/ml, F68 0,05	0,444
21B	70	pH 5, Tre 80 mg/ml	0,359
21C	70	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	0,359
21D	100	pH 5, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	0,409
21E	100	pH 5, Tre 80 mg/ml	0,414
21F	100	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	0,414
21G	100	pH 5, Man 51 mg/ml, F68 0,05	0,445
21H	100	pH 5, Man 51 mg/ml	0,438
21I	100	pH 4,8, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	0,388
21L	100	pH 5,2, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	0,368

Tabla Q: Bioensayo (U/ml) (2-8°C)

	TACI-Fc5 (mg/ml)	Composición	Esperado	tiempo 0	4 sem.	8 sem.	13 sem.
21A	70	pH 5, Tre 96 mg/ml, F68 0,05	350000	347704	365778	319050	387896
21B	70	pH 5, Tre 80 mg/ml	350000	336185	318012	289824	357861
21C	70	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	350000	323222	333715	306941	335181
21D	100	pH 5, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	500000	461204	452442	431738	489743
21E	100	pH 5, Tre 80 mg/ml	500000	458617	439084	435680	470251
21F	100	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	500000	455676	470037	407200	424278
21G	100	pH 5, Man 51 mg/ml, F68 0,05	500000	494293	543338	401277	445267
21H	100	pH 5, Man 51 mg/ml	500000	471667	446056	387503	445371

Tabla R: Bioensayo (U/ml) (25°C)

	TACI-Fc5 (mg/ml)	Composición	Esperado	tiempo 0	4 sem.	8 sem.	13 sem.
21A	70	pH 5, Tre 96 mg/ml, F68 0,05	350000	347704	311541	279159	304644
21B	70	pH 5, Tre 80 mg/ml	350000	336185	302066	268469	342827
21C	70	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	350000	323222	315938	269441	318150
21D	100	pH 5, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	500000	461204	508830	431335	418713
21E	100	pH 5, Tre 80 mg/ml	500000	458617	441768	396159	405400
21F	100	pH 5,4, Tre 80 mg/ml, F68 0,05	500000	455676	449141	387455	476384
21G	100	pH 5, Man 51 mg/ml, F68 0,05	500000	494293	496542	433228	440685
21H	100	pH 5, Man 51 mg/ml	500000	471667	465114	365910	433696

5 Tabla S: Truncado del extremo C

Muestra	Tiempo de estabilidad	Truncado
Carga S128/L20a	-	95,0 %
21E	8 meses 2-8°C	95,3 %
21E	8 meses 25°C	94,7 %

Tabla T: formas enlazadas

Muestra	Tiempo de estabilidad	Pico 1 (fragmento Fc)	Picos 2+3	Pico 4 (Intacto)	Enlazado total
Carga S128/L20a	-	4,2 %	14,0 %	81,8 %	18,2 %
21E	10 meses 2-8°C	4,5 %	15,0 %	80,5 %	19,5 %
21E	10 meses 25°C	8,2 %	37,5 %	54,3 %	45,7 %

RESUMEN DE LOS RESULTADOS PRINCIPALES

10

Cromatografía de exclusión por tamaño

[0141] A 25°C, las formulaciones de 70 mg/ml en general mostraron pendientes menores en relación con la tasa de agregación (% de agregación/mes) que las de 100 mg/ml. En este último grupo, las formulaciones 21D y 21E eran las que presentaban las menores pendientes. A 40°C, la formulación 21E presentaba el valor más bajo de pendiente en el grupo de formulaciones líquidas de 100 mg/ml.

15

AUC

20 [0142] No se observó cambio en el perfil del AUC a 2-8 y 25°C para la formulación 21E. Se detectó una tendencia hacia el aumento de monómero a lo largo del tiempo de estabilidad para las formulaciones de 70 mg/ml.

Desplegado controlado por DC

25 [0143] En el grupo de las formulaciones de 100 mg/ml, 21E era la que presentaba la T_{desp} más alta. Los valores de pH diferentes de 5,0 condujeron a una menor T_{desp} . Las formulaciones de 70 mg/ml presentan valores más altos de T_{desp} (es decir, mayor estabilidad).

Fluorescencia intrínseca

30

[0144] A 40°C, se detectaron variaciones poco importantes en la longitud de onda de emisión máxima para las formulaciones de 70 mg/ml y, en el grupo de candidatos de 100 mg/ml, para la formulación 21E.

RALS

5 [0145] Se producen aumentos notables en RALS para las formulaciones a pH diferente del "óptimo" de 5, después de almacenamiento a 40°C. La dispersión de las formulaciones con manitol era considerablemente más alta que las otras. Las formulaciones 21A, 21B, 21D y 21E eran las que presentaban menores valores de dispersión. Después de almacenamiento a 2-8°C, no mostraron ningún aumento en la luz dispersada.

Anisotropía de la emisión de fluorescencia

10

[0146] No se observaron variaciones en la anisotropía para las formulaciones 21A y 21B después de almacenamiento a 40°C (1 mes). Había variaciones relevantes para las formulaciones 21F y 21H. Se observaron variaciones intermedias para las otras.

15 Dispersión de la luz dinámica

[0147] A 2-8°C, no se detectaron variaciones relevantes en la distribución de tamaños. Se observaron algunas disminuciones en el % de especies más grandes después de almacenamiento a 25°C. No se produjeron aumentos notables de especies de mayor peso molecular después de almacenamiento a 40°C para todas las formulaciones excepto tanto para las que contenían manitol como aquellas a pH diferente de 5,0.

Energía libre del desplegado

25 [0148] En el grupo de las formulaciones de 100 mg/ml, se observó mayor estabilidad termodinámica para las formulaciones 21D y 21E.

Bioensayo

30 [0149] No se observaron disminuciones en la bioactividad a lo largo de 3 meses a 25 y 40°C.

Conclusiones generales

35 [0150] Los estudios de precribado de las formulaciones líquidas han mostrado que el pH óptimo para la estabilización de disoluciones de TACI-Fc5 de 70 mg/ml era aproximadamente pH 5. Cuanto más altos eran los valores de pH, más fuerte era el fenómeno de agregación (evaluado por SE-HPLC) y la aparición de gotas de concentración (calculado por RP-HPLC y densidad óptica). La presencia de sales (tales como NaCl, CaCl₂ y MgCl₂) también conduce a aumentos en los agregados. Los valores de pH menores de 5 tampoco eran óptimos, como se muestra también por los estudios conformacionales por dicroísmo circular a pH = 4,0 comparado con 5,0 en diferentes tampones. Los experimentos de DSC preliminares mostraron que la trealosa y sacarosa tenían algún efecto positivo en la estabilidad de la molécula (es decir, mayores temperaturas de desplegado).

45 [0151] La fase de diseño experimental se dirigía a investigar el efecto de varios excipientes disueltos en tampón de acetato o histidina a pH = 5,0 (también se ensayaron diferentes concentraciones de tampón) en presencia de tensioactivos tales como Lutrol® F-68 y Tween 20. Concentraciones bajas de tampón de acetato en presencia de manitol o trealosa proporcionaron las muestras con una mayor estabilidad frente a la degradación. Lutrol® F-68 parecía más eficaz que Tween 20 en la estabilización de la proteína.

[0152] Los ensayos de fluorescencia y dispersión de la luz dinámica estaban de acuerdo con dichos resultados.

50 [0153] Las muestras candidatas se fabricaron a escala de laboratorio con concentraciones de TACI-FC tanto de 70 como de 100 mg/ml. La trealosa y el manitol se usaron como excipientes (en presencia de tampón de acetato sódico a pH = 4,8, 5,0, 5,2 y 5,4). La evolución de los candidatos a lo largo del tiempo se controló por SE-HPLC y AUC junto con varias herramientas espectroscópicas.

55 [0154] A partir de este estudio, resultó que concentraciones menores de proteína conducían a menor agregación. Se confirmó que el valor de pH óptimo era 5,0. La trealosa era mejor que el manitol en la estabilización de las formulaciones de TACI-Fc. En el grupo de los candidatos de TACI-Fc de 100 mg/ml, la formulación 21E (acetato sódico 10 mM, pH = 5,0, trealosa anhidra 80 mg/ml) presentaba una mayor resistencia frente a la agregación a 40°C (sin aumento estadísticamente significativo de la agregación detectado a 2-8°C). Más precisamente, a 2-8°C el

candidato líquido 21E aumentó su pureza en 1,4% en 26 semanas. A 25°C, la pureza disminuyó en solo 1% (26 semanas).

5 **[0155]** Las formas enlazadas totales del candidato 21E (10 meses a 2-8 y 25°C) se determinaron por análisis de RP-HPLC: no se produjo variación en el contenido de formas enlazadas comparado con el material de fármaco inicial (aproximadamente 19%). Se encontró que el truncado del extremo C era aproximadamente 95%, el mismo que en el material de fármaco inicial; este nivel de truncado se observa normalmente para anticuerpos humanos.

10 **[0156]** El nivel de formas oxidadas también se comprobó por análisis de RP-MALDI en el candidato líquido 21E (almacenado durante 10 meses a 2-8 y 25°C): comparado con el fármaco a partir del cual se prepara, no se observó aumento significativo en la oxidación tras almacenamiento (aproximadamente 2,4%).

EJEMPLO 2: COMPATIBILIDAD DE TACI-FC CON AGENTES BACTERIOSTÁTICOS

15 Objetivo:

[0157] El objetivo de este estudio era evaluar la compatibilidad de TACI-Fc con diferentes agentes bacteriostáticos en vista de una formulación de múltiples dosis. Se ensayaron los siguientes agentes bacteriostáticos: alcohol bencílico al 0,9%; m-cresol al 0,3%; fenol al 0,5%; clorobutanol al 0,5%; feniletanol al 0,5%, alcohol bencílico al 0,3% + cloruro de benzalconio al 0,001%.

Resultados clave

Fármaco + bacteriostáticos:

25

[0158]

- Se observaron aumentos (15-70%) en los agregados totales (por SEC), después de 2 semanas de almacenamiento a 40°C, para el fármaco en presencia de conservantes, comparado con la muestra de referencia (sin bacteriostático añadido); se observaron tasas de degradación comparables a 25°C y 2-8°C.

30

- El agente bacteriostático que demostró tener la influencia menos negativa (de acuerdo con los análisis de SEC y DC) era la mezcla de alcohol bencílico + cloruro de benzalconio.

Candidato líquido + bacteriostáticos:

35

[0159]

- La adición de conservantes al candidato líquido de TACI-Fc (acetato pH 5, trealosa) conduce a aumentos de la agregación menos pronunciados (aproximadamente 10-25%, después de 2 semanas a 40°C) que los observados para el fármaco. Esto demuestra la eficacia de la trealosa para prevenir la agregación y pérdida de la estructura secundaria natural (como se pone de manifiesto por los experimentos de DC de UV lejano).

40

- La asociación de alcohol bencílico + cloruro de benzalconio proporciona los mejores resultados, entre el grupo de formulaciones en presencia de conservantes, en términos de tasa de agregación.

45 Conclusión

[0160] Se evaluó el impacto de varios agentes bacteriostáticos en la integridad de la proteína en fármacos de TACI-Fc (fármaco natural) y en TACI-Fc formulado con 100 mg/ml formulado en acetato-Na y trealosa a pH 5.

50

[0161] La inclusión de cualquiera de los agentes bacteriostáticos afectaba negativamente a la integridad de la proteína en particular en el fármaco natural. La asociación de alcohol bencílico al 0,3% + cloruro de benzalconio al 0,001% resultó ser la menos perjudicial para la estructura de la proteína.

EJEMPLO 3: ESTABILIDAD DEL CANDIDATO LÍQUIDO DE TACI-FC EN JERINGAS PRECARGADAS

55

Objetivo

[0162] El objetivo del estudio era evaluar la estabilidad de la formulación líquida de TACI-Fc (Acetato-Na, trealosa, pH 5) de 100 mg/ml cargada en jeringas Hypak de 1 ml tapadas con dos tipos de émbolos de caucho (W4023/50 y

W4023/50G FluroTec).

Resultados clave

- 5 **[0163]** Los resultados se pueden resumir como sigue para TACI-Fc 100 mg/ml cargado en jeringas de vidrio de 1 ml tapadas con émbolos recubiertos (W4023/50G FluroTec) y no recubiertos (W4023/50G), ensayados hasta 6 meses:
- Dímeros y HMW (alto peso molecular): la tasa de degradación era comparable a 40°C (1,5% de aumento/semana) y 25°C (0,5% de aumento/mes). Se observó un comportamiento ligeramente diferente a 2-8°C, aunque no impactaba significativamente en la estabilidad global: 0,2% y 0,1% de aumento/mes para dos lotes de fabricación diferentes;
 - Contenido de proteína: no se observó disminución del contenido de proteína tras almacenamiento;
 - 15 - Formas enlazadas: se midió un nivel comparable de formas enlazadas frente al producto en los viales (sin aumento a 2-8°C comparado con el fármaco, aproximadamente 40% a 25°C después de 5 meses);
 - Biopotencia: la actividad biológica se retiene hasta 3 meses (2-8°C y 25°C)
 - 20 - pH: no se observó desplazamiento del pH tras almacenamiento.

Conclusión

- 25 **[0164]** La formulación líquida de TACI-Fc de 100 mg/ml (tampón de acetato a pH 5 + trealosa) cargada en jeringas Hypak de 1 ml era estable. Los dos tipos de émbolos de caucho (W4023/50 y W4023/50G FluroTec) evaluados en el estudio eran equivalentes y no afectaban a la estabilidad de la formulación líquida.

EJEMPLO 4: ESTABILIDAD DE ATACICEPT EN DIFERENTES CONCENTRACIONES EN JERINGAS PRECARGADAS

- 30 **[0165]** Se evaluó la estabilidad de atacicept en diferentes concentraciones en jeringas precargadas. La metodología se llevó a cabo como se describe en el ejemplo 1.

- 35 **[0166]** La composición de las muestras ensayadas era la siguiente:

Lote ID	Atacicept mg/ml	Tampón	Trealosa dihidrato mg/ml
Atacicept 25/1	25	acetato sódico 10 mM, pH 5	88,4
Atacicept 75/1	75	acetato sódico 10 mM, pH 5	88,4
Atacicept 150/1	150	acetato sódico 10 mM, pH 5	88,4
Atacicept 25/1,2	20,5	acetato sódico 10 mM, pH 5	88,4
Atacicept 150/1,2	125	acetato sódico 10 mM, pH 5	88,4

- [0167]** Los resultados del estudio de estabilidad se dan en las siguientes tablas U a Z

Tabla U: % de pureza por SE-HPLC

A 5 °C, después de 1, 2, 3, 6, 9, 12 y 18 meses:

	Tiempo cero			1 mes +5°C		
	HMW+Dímero	M	LMW	HMW+Dímero	M	LMW
Atacicept 25/1	0,4	99,0	0,5	0,4	99,2	0,4
Atacicept 75/1	0,5	99,0	0,5	0,6	99,1	0,3
Atacicept 150/1	0,5	99,0	0,5	0,7	98,8	0,4
Atacicept 25/1,2	0,5	99,1	0,4	0,5	99,1	0,4
Atacicept 150/1,2	0,6	99,0	0,4	0,7	98,9	0,5

	2 meses + 5°C			3 meses +5°C		
	HMW+Dímero	M	LMW	HMW+Dímero	M	LMW
Atacept 25/1	0,4	99,2	0,4	0,4	99,1	0,5
Atacept 75/1	0,6	99,1	0,3	0,6	99,2	0,3
Atacept 150/1	0,8	98,7	0,5	1,0	98,4	0,7
Atacept 25/1,2	0,5	99,2	0,3	0,4	98,7	1,0
Atacept 150/1,2	0,7	98,8	0,5	0,6	98,9	0,6

	6 meses + 5°C			3 meses +5°C		
	HMW+Dímero	M	LMW	HMW+Dímero	M	LMW
Atacept 25/1	0,4	99,3	0,4	0,3	99,3	0,4
Atacept 75/1	0,7	99,0	0,4	0,8	98,9	0,3
Atacept 150/1	1,1	98,7	0,3	1,2	98,4	0,4
Atacept 25/1,2	0,3	99,3	0,4	0,4	99,3	0,4
Atacept 150/1,2	0,8	98,7	0,4	1,0	98,5	0,5

	12 meses + 5°C			18 meses +5°C		
	HMW+Dímero	M	LMW	HMW+Dímero	M	LMW
Atacept 25/1	0,3	99,2	0,4	0,4	99,3	0,3
Atacept 75/1	0,9	98,9	0,3			
Atacept 150/1	1,3	98,2	0,5	1,9	97,8	0,4
Atacept 25/1,2	0,4	99,2	0,4	0,4	99,3	0,3
Atacept 150/1,2	1,3	98,3	0,5	1,6	97,9	0,5

A 25 °C, después de 1, 2, 3 y 6 meses:

	Tiempo cero			1 mes +25°C			2 meses +25°C		
	HMW+Dímero	M	LMW	HMW+Dímero	M	LMW	HMW+Dímero	M	LMW
Atacept 25/1	0,4	99,0	0,5	0,4	98,9	0,7	0,4	98,8	0,8
Atacept 75/1	0,5	99,0	0,5	0,9	98,5	0,6	1,4	97,8	0,8
Atacept 150/1	0,5	99,0	0,5	2,0	97,1	0,9	2,8	96,1	1,2
Atacept 25/1,2	0,5	99,1	0,4	0,4	99,0	0,6	0,3	98,8	0,9
Atacept 150/1,2	0,6	99,0	0,4	1,5	97,7	0,9	2,3	96,3	1,4

	3 meses +25°C			6 meses +25°C		
	HMW+Dímero	M	LMW	HMW+Dímero	M	LMW
Atacept 25/1	0,4	98,5	1,1	0,4	98,2	1,4
Atacept 75/1	1,6	97,7	0,7	2,6	96,1	1,3
Atacept 150/1	3,7	94,8	1,5	5,8	92,1	2,1
Atacept 25/1,2	0,3	98,5	1,2	0,3	98,4	1,3
Atacept 150/1,2	2,5	96,0	1,5	4,3	94,1	1,6

5

Tabla V: Contenido de proteína por SE-HPLC (mg/ml)

A 5 °C, después de 1, 2, 3, 6, 9, 12 y 18 meses:

	Tiempo cero	1 Mes +5°C	2 Meses +5°C	3 Meses +5°C
Atacept 25/1	23,9	27,9	22,7	21,9
Atacept 75/1	75,0	80,4	77,9	76,6
Atacept 150/1	150,0	165,5	160,2	161,0
Atacept 25/1,2	21,8	24,3	23,6	22,0
Atacept 150/1,2	138,1	138,4	144,9	148,5

	6 Meses +5°C	9 Meses +5°C	12 Meses +5°C	18 Meses +5°C
Atacept 25/1	25,1	24,9	26,1	25,2
Atacept 75/1	80,1	78,8	77,2	
Atacept 150/1	156,5	152,0	157,9	152,1
Atacept 25/1,2	22,3	21,3	22,2	21,6
Atacept 150/1,2	136,3	134,1	132,4	126,1

A 25 °C, después de 1, 2, 3 y 6 meses:					
	Tiempo cero	1 Mes +25°C	2 Meses +25°C	3 Meses +25°C	6 Meses +25°C
Atacept 25/1	23,9	28,0	21,5	21,9	25,1
Atacept 75/1	75,0	80,1	77,4	73,5	79,8
Atacept 150/1	150,0	163,8	165,5	162,8	152,2
Atacept 25/1,2	21,8	22,9	23,4	21,3	21,6
Atacept 150/1,2	138,1	141,6	137,2	147,7	128,6

A 40 °C, después de 1, 2 y 4 semanas:				
	Tiempo cero	1 semana +40°C	2 semanas +40°C	4 semanas +40°C
Atacept 75/1	75,0	71,7	71,9	71,8

Tabla W: Formas enlazadas (%)

A 5 °C, después de 1, 2, 3, 6, 9, 12 y 18 meses:				
	Tiempo cero	1 Mes +5°C	2 Meses +5°C	3 Meses +5°C
Atacept 25/1	11,0	12,8	12,8	12,5
Atacept 75/1	11,6	13,8	12,1	13,0
Atacept 150/1	11,5	12,3	13,5	13,1
Atacept 25/1,2	12,7	12,7	12,8	13,5
Atacept 150/1,2	12,3	13,0	12,5	14,1

5

	6 Meses +5°C	9 Meses +5°C	12 Meses +5°C	18 Meses +5°C
Atacept 25/1	14,1	14,7	15,4	18,4
Atacept 75/1	13,5	15,4	16,7	
Atacept 150/1	14,3	16,1	16,7	19,3
Atacept 25/1,2	15,9	15,8	16,9	18,5
Atacept 150/1,2	15,4	16,5	18,6	18,7

A 25 °C, después de 1, 2, 3 y 6 meses:					
	Tiempo cero	1 Mes +25°C	2 Meses +25°C	3 Meses +25°C	6 Meses +25°C
Atacept 25/1	11,0	17,5	20,1	25,8	32,8
Atacept 75/1	11,6	17,4	20,4	24,1	33,8
Atacept 150/1	11,5	18,3	21,7	26,7	35,1
Atacept 25/1,2	12,7	16,7	20,6	25,4	34,9
Atacept 150/1,2	12,3	17,1	22,1	26,7	37,3

Tabla X: % de Fc libre por IEC-HPLC

A 5 °C, después de 1, 2, 3, 6, 9, 12 y 18 meses:				
	Tiempo cero	1 Mes +5°C	2 Meses +5°C	3 Meses +5°C
Atacept 25/1	-	0,08	0,08	0,08
Atacept 75/1	0,09	0,14	0,14	0,11
Atacept 150/1	-	0,09	0,09	0,10
Atacept 25/1,2	0,09	0,08	0,09	0,09
Atacept 150/1,2	0,08	0,09	0,11	0,13

	6 Meses +5°C	9 Meses +5°C	12 Meses +5°C	18 Meses +5°C
Atacept 25/1	0,18	0,13	0,12	0,12
Atacept 75/1	0,12	0,13	0,12	
Atacept 150/1	0,19	0,16	0,15	0,16
Atacept 25/1,2	0,11	0,11	0,12	0,11
Atacept 150/1,2	0,13	0,17	0,15	0,16

10

A 25 °C, después de 1, 2, 3 y 6 meses:

	Tiempo cero	1 Mes +25°C	2 Meses +25°C	3 Meses +25°C	6 Meses +25°C
Atacept 25/1	-	0,17	0,22	0,40	0,77
Atacept 75/1	0,09	0,25	0,39	0,43	0,72
Atacept 150/1	-	0,20	0,32	0,52	0,87
Atacept 25/1,2	0,09	0,13	0,30	0,49	0,70
Atacept 150/1,2	0,08	0,18	0,38	0,51	0,81

Tabla Y: Actividad biológica (U/ml)

A 5 °C, después de 1, 2, 3, 6, 9, 12 y 18 meses:

	Tiempo cero	1 Mes +5°C	2 Meses +5°C	3 Meses +5°C
Atacept 25/1	140213	137160	134504	135542
Atacept 75/1	423184	410261	379575	374383
Atacept 150/1	836070	774584	754834	819172
Atacept 25/1,2	111981	115990	126041	121648
Atacept 150/1,2	646679	642858	743090	694864

	6 Meses +5°C	9 Meses +5°C	12 Meses +5°C	18 Meses +5°C
Atacept 25/1	126923	147341	130609	108207
Atacept 75/1	363668	468484	346080	
Atacept 150/1	814539	843419	809840	565084
Atacept 25/1,2	114946	123750	106004	113312
Atacept 150/1,2	645404	714223	620301	550851

A 25 °C, después de 1, 2, 3 y 6 meses:

	Tiempo cero	1 Mes +25°C	2 Meses +25°C	3 Meses +25°C	6 Meses +25°C
Atacept 25/1	140213	134212	124601	132349	118224
Atacept 75/1	423184	387654	336790	365202	327925
Atacept 150/1	836070	776645	719725	760795	677110
Atacept 25/1,2	111981	114068	117615	114296	103328
Atacept 150/1,2	646679	694993	696945	606957	586586

5

Tabla Z: Determinación de pH

A 5 °C, después de 1, 2 y 3 meses:

	Tiempo cero	1 Mes +5°C	2 Meses +5°C	3 Meses +5°C
Atacept 25/1	5,0	5,0	4,9	4,9
Atacept 75/1	5,1	5,1	5,1	5,1
Atacept 150/1	5,0	5,1	5,0	4,9
Atacept 25/1,2	5,0	4,9	4,9	4,8
Atacept 150/1,2	5,0	5,0	4,9	4,9

	6 Meses +5°C	9 Meses +5°C	12 Meses +5°C	18 Meses +5°C
Atacept 25/1	5,0	4,9	5,1	4,9
Atacept 75/1	5,0	5,1	5,1	
Atacept 150/1	5,1	5,0	5,2	5,0
Atacept 25/1,2	4,9	4,9	5,0	5,0
Atacept 150/1,2	5,0	5,0	5,0	5,0

A 25 °C, después de 1, 2, 3 y 6 meses:

	Tiempo cero	1 Mes +25°C	2 Meses +25°C	3 Meses +25°C	6 Meses +25°C
Atacept 25/1	5,0	4,9	4,9	4,9	5,0
Atacept 75/1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1
Atacept 150/1	5,0	5,0	5,0	4,9	5,1
Atacept 25/1,2	5,0	4,9	4,9	4,8	4,9
Atacept 150/1,2	5,0	5,0	4,9	4,9	5,0

EJEMPLO 5: PRODUCCIÓN DE ANTAGONISTA DE BLYS

[0168] Se generaron 4 versiones truncadas amino terminales de TACI-Fc. Las 4 tenían una secuencia señal del activador tisular de plasminógeno humano modificada como se describe en el documento WO 02/094852 (SEQ ID NO: 25) fusionada con el resto de aminoácido número 30 de la SEQ ID NO: 6. Sin embargo, las 4 proteínas diferían en la localización del punto en el que el "Fc5" estaba fusionado con la secuencia de aminoácidos de TACI del SEQ ID NO: 6. La tabla 1 resume las estructuras de las 4 proteínas de fusión.

Tabla 1

Proteínas de fusión TACI-Fc	
Designación de TACI-Fc	Restos de aminoácidos de TACI
TACI(d1-29)-Fc5	de 30 a 154 de SEQ ID NO: 6
TACI(d1-29, d107-154)-Fc5	de 30 a 106 de SEQ ID NO: 6
TACI(d1-29, d111-154)-Fc5	de 30 a 110 de SEQ ID NO: 6
TACI(d1-29, d120-154)-Fc5	de 30 a 119 de SEQ ID NO: 6

[0169] Se generaron casetes de expresión que codifican la proteína por superposición de PCR usando técnicas estándar (véase, por ejemplo, Horton y col., 1989). Se usaron una molécula de ácido nucleico que codifica TACI y una molécula de ácido nucleico que codifica Fc5 para los moldes de la PCR. Los cebadores oligonucleótidos se identifican en las tablas 2 y 3.

Tabla 2

Cebadores oligonucleótidos para producir proteínas de fusión de TACI				
Designaciones de TACI-Fc	Designaciones de oligonucleótidos			
	5' TACI	3' TACI	5' Fc5	3' Fc5
TACI(d1-29)-Fc5	ZC24,90 3	ZC24,95 5	ZC24,95 2	ZC24,94 6
TACI(d1-29, d107-154)-Fc5	ZC24,90 3	ZC24,95 1	ZC24,94 9	ZC24,94 6
TACI(d1-29, d111-154)-Fc5	ZC24,90 3	ZC28,97 8	ZC28,97 9	ZC24,94 6
TACI(d1-29, d120-154)-Fc5	ZC24,90 3	ZC28,98 1	ZC28,98 0	ZC24,94 6

Tabla 3

Secuencias de oligonucleótidos		
Cebador	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO
ZC24,90 3	5' TATTAGGCCGGCCACCATGGATGCAATGA 3'	15
ZC24,95 5	5' TGAAGATTTGGGCTCCTTGAGACCTGGGA 3'	16
ZC24,95 2	5' TCCCAGGTCTCAAGGAGCCCAAATCTTCA 3'	17
ZC24,94 6	5' TAATTGGCGCGCCTCTAGATTATTTACCCGGAGACA 3'	18
ZC24,95 1	5' TGAAGATTTGGGCTCGTTCTCACAGAAGTA 3'	19
ZC24,94 9	5' ATAATTCTGTGAGAACGAGCCCAAATCTTCA 3'	20
ZC28,97 8	5' TTTGGGCTCGCTCCTGAGCTTGTCTCACA 3'	21
ZC28,97 9	5' CTCAGGAGCGAGCCCAAATCTTCAGACA 3'	22
ZC28,98 1	5' TTTGGGCTCCCTGAGCTCTGGTGGAA 3'	23
ZC28,98 0	5' GAGCTCAGGGAGCCCAAATCTTCAGACA 3'	24

[0170] La primera amplificación por PCR consistía en dos reacciones para cada una de las cuatro versiones truncadas amino terminales. Las dos reacciones se llevaron a cabo por separado usando los oligonucleótidos 5' y 3' TACI en una reacción, y los oligonucleótidos 5' y 3' Fc5 en otra reacción, para cada versión. Las condiciones de la primera serie de amplificaciones por PCR eran las siguientes. A un volumen final de 25 µl se añadieron aproximadamente 200 ng de ADN molde, 2,5 µl de 10x tampón de reacción de Pfu (Stratagene), 2 µl de dNTP 2,5 mM, 0,5 µl de cada uno del oligonucleótido 5' y oligonucleótido 3' 20 µM y 0,5 µl de Pfu polimerasa (2,5 unidades, Stratagene). El perfil térmico de la amplificación consistía en 94°C durante 3 min, 35 ciclos a 94°C durante 15 s, 50°C durante 15 s, 72°C durante 2 min, seguido por una extensión de 2 min a 72°C. Los productos de reacción se fraccionaron por electroforesis en gel de agarosa, y las bandas correspondientes a los tamaños previstos se cortaron del gel y se recuperaron usando un kit de extracción de gel QIAGEN QIAQUICK (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0171] La segunda amplificación por PCR, o reacción de amplificación de superposición de PCR, se llevó a cabo

usando fragmentos purificados de gel de la primera PCR como molde de ADN. Las condiciones de la segunda amplificación por PCR eran las siguientes. A un volumen final de 25 µl se añadieron aproximadamente 10 ng de ADN molde de cada uno del fragmento de TACI y fragmento de Fc5, 2,5 µl de 10x tampón de reacción de Pfu (Stratagene), 2 µl de dNTP 2,5 mM, 0,5 µl de cada uno de ZC24, 903 (SEQ ID NO: 15) y ZC24, 946 (SEQ ID NO: 18) 20 µM y 0,5 µl de Pfu polimerasa (2,5 unidades, Stratagene). El perfil térmico de la amplificación consistía en 94°C durante 1 min, 35 ciclos a 94°C durante 15 s, 55°C durante 15 s, 72°C durante 2 min, seguido por una extensión de 2 min a 72°C. Los productos de reacción se fraccionaron por electroforesis en gel de agarosa, y las bandas correspondientes a los tamaños previstos se cortaron del gel y se recuperaron usando un kit de extracción de gel QIAGEN QIAQUICK (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0172] Cada una de las 4 versiones de los productos de PCR de TACI-Fc truncados en el amino terminal se clonaron por separado usando el kit de clonación ZEROBLUNT TOPO PCR de Invitrogen, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. La tabla 4 identifica las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de estas construcciones de TACI-Fc.

Tabla 4

Secuencias de variantes de TACI-Fc		
Designación de TACI-Fc	SEQ ID N°	
	Nucleótidos	Aminoácidos
TACI(d1-29)-Fc5	7	8
TACI(d1-29, d107-154)-Fc5	9	10
TACI(d1-29, d111-154)-Fc5	11	12
TACI(d1-29, d120-154)-Fc5	13	14

[0173] Después de verificar las secuencias de nucleótidos, los plásmidos que comprendían cada una de las cuatro versiones de las fusiones de TACI-Fc truncadas en el amino terminal, se digirieron con FseI y AseI para liberar los segmentos que codifican aminoácidos. Los fragmentos FseI-AseI se ligaron en un vector de expresión de mamífero que contenía un promotor de CMV y un segmento SV40 poliA. Se introdujeron vectores de expresión en células de ovario de hámster chino como se describe a continuación.

EJEMPLO 6: PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS TACI-FC POR CÉLULAS DE OVARIO DE HÁMSTER CHINO

[0174] Se usaron las construcciones de expresión de TACI-Fc para la transfección por electroporación de células DG44 de ovario de hámster chino (CHO) adaptadas a suspensión, cultivadas en medio exento de proteínas animales (Urlaub y col., 1986). Las células de CHO DG44 carecen de un gen funcional de dihidrofolato reductasa debido a eliminaciones en ambas localizaciones cromosómicas de dihidrofolato reductasa. El cultivo de las células en presencia de concentraciones crecientes de metotrexato produce la amplificación del gen de la dihidrofolato reductasa, y la proteína recombinante codificada por el gen unido en la construcción de expresión.

[0175] Las células CHO DG44 se pasaron en medio PFCHO (JRH Biosciences, Lenexa, KS), L-glutamina 4 mM (JRH Biosciences), y 1x complemento de hipoxantina-timidina (Life Technologies), y las células se incubaron a 37°C y CO₂ al 5% en matraces de agitación Corning a 120 rpm en una plataforma de agitador giratorio. Las células se transfectaron por separado con plásmidos de expresión linearizados. Para asegurar la esterilidad, se llevó a cabo una sola etapa de precipitación con etanol sobre hielo durante 25 min, combinando 200 µg de ADN plasmídico en un tubo Eppendorf con 20 µl de ADN vehículo de esperma de salmón fraccionado (5' → 3' Inc. Boulder, CO, 10 mg/ml), 22 µl de NaOAc 3 M (pH 5,2), y 484 µl de etanol al 100% (Gold Shield Chemical Co., Hayward, CA). Después de incubación, el tubo se centrifugó a 14.000 rpm en una microfuga puesta en una habitación fría a 4°C, se separó el líquido sobrenadante y el sedimento se lavó dos veces con 0,5 ml de etanol al 70% y se dejó secar al aire.

[0176] Las células CHO DG44 se prepararon mientras el sedimento de ADN se secaba por centrifugación de 10⁶ células totales (16,5 ml) en un tubo de centrífuga cónico de 25 ml a 900 rpm durante 5 min. Las células CHO DG44 se volvieron a suspender en un volumen total de 300 µl de medio de crecimiento PFCHO, y se pusieron en una cubeta Gene-Pulser con una separación de electrodos de 0,4 cm (Bio-Rad). El ADN, después de aproximadamente 50 min de tiempo de secado, se volvió a suspender en 500 µl de medio de crecimiento PFCHO y se añadió a las células en la cubeta de modo que el volumen total no superaba 800 µl y se dejó depositar a temperatura ambiente durante 5 min para disminuir la formación de burbujas. La cubeta se puso en una unidad Gene Pulser II de BioRad a 0,296 kV (kilovoltios) y 0,950 HC (alta capacitancia) y se electroporó inmediatamente.

[0177] Las células se incubaron 5 min a temperatura ambiente antes de ponerlas en un volumen total de 20 ml de medio PFCHO en un matraz T-75 CoStar. El matraz se puso a 37°C y CO₂ al 5% durante 48 h y después se contaron las células con un hemocitómetro usando exclusión con tinta azul de trypan y se pusieron en medio de selección PFCHO sin complemento de hipoxantina-timidina y que contenía metotrexato 200 mM (Cal Biochem).

[0178] Después de recuperación del procedimiento de selección con metotrexato, el medio condicionado que contenía las proteínas TACI-Fc secretadas se examinó por análisis de transferencia Western.

REFERENCIAS

[0179]

- Altschul S F et al, J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990.
 Altschul S F et al, Nucleic Acids Res., 25:389-3402, 1997.
 Armour KL. y col., 1999. Recombinant human IgG molecules lacking Fcγ receptor I binding and monocyte triggering activities. Eur J Immunol. 29 (8) : 2613-24
 Canfield SM, Morrison SL. The binding affinity of human IgG for its high affinity Fc receptor is determined by multiple amino acids in the CH2 domain and is modulated by the hinge region. J Exp Med 1991; 173:1483-1491.
 Cheema y col. Arthritis Rheum 2001; 44(6): 1313- 1319.
 Devereux J et al, Nucleic Acids Res, 12, 387-395, 1984.
 Do RKG, Hatada E, Lee H, Tourigny MR, Hilbert D, Chen-Kiang S. Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response. J Exp Med 2000; 192 (7) : 953- 964.
 Duncan y col., Nature 332:563 (1988). Grantham y col., Science, Vol. 185, pp. 862-864 (1974).
 Groom y col. J Clin Invest 2002; 109 (1) : 59- 68; Mariette X, Ann Rheum Dis 2003; 62 (2) : 168- 171.
 Gross y col. Nature 2000; 404:995-999; Horton y col., Gene 77:61 (1989).
 Kabat EA, Glusman M, Knaub V. Quantitative estimation of the albumin and gamma globulin in normal and pathologic cerebrospinal fluid by immunochemical methods. Am J Med 1948; 4:653-662.
 Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., and Foeller, C. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., National Institutes of Health, Bethesda, MD.
 Kalled SL. The role of BAFF in immune function and implications for autoimmunity. Immunol Rev 2005; 204:43-54.
 Mackay y col. J Exp Me 1999; 190(11); 1697-1710.
 Marsters SA, Yan M, Pitti RM, Haas PE, Dixit VM, Ashkenazi A. Interaction of the TNF homologues BLYS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI. Curr Biol 2000; 10 (13) : 785-788.
 Moore y col. Science 1999; 285 (5425) : 260- 263; Schneider y col. J Exp Med 1999; 189 (11) : 1747- 1756;
 Do y col. J Exp Med 2000; 192 (7) : 953- 964.
 Pearson, Methods Enzymol. 1990;183:63-98.
 Roschke V, Sosnovtseva S, Ward CD, Hong JS, Smith R, Albert V y col. BLYS and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. J Immunol 2002; 169:4314-4321.
 Rudick y col., Neurology 2001; 56:1324-1330.
 Schneider P, Mackay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer J- L, Holler N. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. J Exp Med 1999; 189 (11) : 1747-1756.
 Shields RL. y col., 2001. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcγRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. J Biol Chem. 276 (9) : 6591- 604.
 Soderstrom M, Link H, Xu Z, Fredriksson S. Optic neuritis and multiple sclerosis: Anti-MBP and anti-MBP peptide antibody-secreting cells are accumulated in CSF. Neurology 1993; 43:1215-1222.
 Soderstrom M y col., Nature 406:267 (2000).
 Tao M-H, Smith RIF, Morrison SL. Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific differences in complement activation. J Exp Med 1993; 178:661-667.
 Thangarajh M, Gomes A, Masterman T, Hillert J, Hjelmstrom P. Expression of B-cell activating factor of the TNF family (BAFF) and its receptors in multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2004; 152:183-190.
 Thompson JS, Bixler SA, Qian F, Vora K, Scott ML, Cachero TG. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. Science 2001; 293:2108-2111.
 Urlaub y col., Som. Cell. Molec. Genet. 12:555 (1986).
 Wines y col., J. Immunol. 164:5313 (2000).

LISTA DE SECUENCIAS

[0180]

<110> Ares Trading S.A.

<120> Formulaciones para proteínas de fusión TACI-inmunoglobulina

5 <130> 1190 WO/PCT

<150> EP 07120489.5

<151> 2007-11-12

<150> EP 07120490.3

<151> 2007-11-12

10 <150> US 61/002.988

<151> 2007-11-14

<150> US 61/003.028

<151> 2007-11-14

<150> US 61/072.038

15 <151> 2008-03-27

<150> EP 08005923.1

<151> 2008-03-27

<160> 25

<170> PatentIn version 3.5

20 <210> 1

<211> 166

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

25

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

<210> 2
<211> 232
5 <212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 2

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 3

<211> 313
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 3

5

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 210 215 220
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 225 230 235 240
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 245 250 255
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 260 265 270
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 275 280 285
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 290 295 300
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 305 310

- <210> 4
- <211> 762
- 5 <212> ADN
- <213> homo sapiens
- <220>
- <221> CDS
- <222> (7)..(759)
- 10 <400> 4

ggatcc	atg	aag	cac	ctg	tgg	ttc	ttc	ctc	ctg	ctg	gtg	gcg	gct	ccc		48
	Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro		
1					5					10						
aga	tgg	gtc	ctg	tcc	gag	ccc	aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	96
Arg	Trp	Val	Leu	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	
15					20					25					30	
cca	ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa	ctc	ctg	ggg	gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	144
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	
				35					40					45		
ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	192
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	
			50					55					60			
gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	240
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	
		65					70					75				
ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	288
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
	80					85					90					
ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	336
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
95					100					105					110	
acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	384
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
				115					120				125			
gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	432
Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
			130					135					140			
gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	480
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
		145					150					155				
cgg	gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	528
Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
	160				165					170						
ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	576
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	
175					180					185					190	
ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	624
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	
				195					200					205		
tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	672
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	
			210					215					220			
cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	720
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	
		225					230					235				
cac	tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	ggt	aaa	tga			762
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
	240					245					250					

<210> 5
<211> 251
<212> PRT
<213> homo sapiens
5 <400> 5

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
20 25 30

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
35 40 45

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
50 55 60

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
65 70 75 80

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
85 90 95

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
100 105 110

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
115 120 125

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
130 135 140

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
145 150 155 160

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
165 170 175

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
180 185 190

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
195 200 205

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
210 215 220

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
225 230 235 240

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245 250

<210> 6
 <211> 293
 <212> PRT
 5 <213> homo sapiens
 <400> 6

```

Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp
 1          5          10          15

Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly Val Ala Met Arg
 20          25          30

Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met
 35          40          45

Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala
 50          55          60

Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp
 65          70          75          80

His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His
 85          90          95

Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val
    
```

	100		105		110
Asn	Leu	Pro	Pro	Glu	Leu
	115				Arg
			Arg	Gln	Arg
				Ser	Gly
					Glu
					125
				Val	Glu
					Asn
Asn	Ser	Asp	Asn	Ser	Gly
	130				Arg
					135
				Tyr	Gln
				Gly	Leu
					Glu
					140
				His	Arg
				Gly	Ser
Glu	Ala	Ser	Pro	Ala	Leu
145					150
				Pro	Gly
				Leu	Lys
					Leu
					155
				Ser	Ala
				Asp	Gln
					Val
Ala	Leu	Val	Tyr	Ser	Thr
				165	
				Leu	Gly
				Leu	Cys
					170
				Leu	Cys
				Ala	Val
					Leu
					175
Cys	Phe	Leu	Val	Ala	Val
					180
				Ala	Cys
					185
				Phe	Leu
				Lys	Lys
				Arg	Gly
					190
				Asp	Pro
Cys	Ser	Cys	Gln	Pro	Arg
					200
				Ser	Arg
				Gln	Ser
					205
				Pro	Ala
				Lys	Ser
Ser	Gln	Asp	His	Ala	Met
					210
				Glu	Ala
					215
				Gly	Ser
				Pro	Val
					220
				Ser	Thr
				Ser	Pro
Glu	Pro	Val	Glu	Thr	Cys
225					230
				Ser	Phe
				Cys	Phe
					235
				Pro	Glu
				Cys	Arg
				Ala	Pro
					240
Thr	Gln	Glu	Ser	Ala	Val
					245
				Thr	Pro
				Gly	Thr
					250
				Pro	Asp
				Pro	Thr
					Cys
					255
				Ala	Pro
Gly	Arg	Trp	Gly	Cys	His
					260
				Thr	Arg
					265
				Thr	Thr
				Val	Leu
				Gln	Pro
					270
				Cys	Pro
His	Ile	Pro	Asp	Ser	Gly
					275
				Leu	Gly
					280
				Ile	Val
				Cys	Val
					285
				Pro	Ala
				Gln	Glu
Gly	Gly	Pro	Gly	Ala	
					290

<210> 7
 <211> 1214
 5 <212> ADN
 <213> homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (17) .. (1192)
 10 <400> 7

ES 2 436 779 T3

tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg	52
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu	
1 5 10	
ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc	100
Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala	
15 20 25	

gag Glu	ttg Leu 30	aga Arg	cgc Arg	ttc Phe	cgt Arg 35	aga Arg	gct Ala	atg Met	aga Arg	tcc Ser	tgc Cys 40	ccc Pro	gaa Glu	gag Glu	cag Gln	148
tac Tyr 45	tgg Trp	gat Asp	cct Pro	ctg Leu 50	ctg Leu	ggt Gly	acc Thr	tgc Cys	atg Met	tcc Ser 55	tgc Cys	aaa Lys	acc Thr	att Ile	tgc Cys 60	196
aac Asn	cat His	cag Gln	agc Ser	cag Gln 65	cgc Arg	acc Thr	tgt Cys	gca Ala 70	gcc Ala	ttc Phe	tgc Cys	agg Arg	tca Ser	ctc Leu 75	agc Ser	244
tgc Cys	cgc Arg	aag Lys	gag Glu 80	caa Gln	ggc Gly	aag Lys	ttc Phe	tat Tyr 85	gac Asp	cat His	ctc Leu	ctg Leu	agg Arg 90	gac Asp	tgc Cys	292
atc Ile	agc Ser	tgt Cys 95	gcc Ala	tcc Ser	atc Ile	tgt Cys	gga Gly 100	cag Gln	cac His	cct Pro	aag Lys	caa Gln 105	tgt Cys	gca Ala	tac Tyr	340
ttc Phe	tgt Cys 110	gag Glu	aac Asn	aag Lys	ctc Leu	agg Arg 115	agc Ser	cca Pro	gtg Val	aac Asn	ctt Leu 120	cca Pro	cca Pro	gag Glu	ctc Leu	388
agg Arg 125	aga Arg	cag Gln	cgg Arg	agt Ser	gga Gly 130	gaa Glu	gtt Val	gaa Glu	aac Asn	aat Asn 135	tca Ser	gac Asp	aac Asn	tgc Ser	gga Gly 140	436
agg Arg	tac Tyr	caa Gln	gga Gly	ttg Leu 145	gag Glu	cac His	aga Arg	ggc Gly	tca Ser 150	gaa Glu	gca Ala	agt Ser	cca Pro	gct Ala 155	ctc Leu	484
cca Pro	ggt Gly	ctc Leu	aag Lys 160	gag Glu	ccc Pro	aaa Lys	tct Ser	tca Ser 165	gac Asp	aaa Lys	act Thr	cac His	aca Thr 170	tgc Cys	cca Pro	532
ccg Pro	tgc Cys	cca Pro 175	gca Ala	cct Pro	gaa Glu	gcc Ala	gag Glu 180	ggg Gly	gca Ala	ccg Pro	tca Ser	gtc Val 185	ttc Phe	ctc Leu	ttc Phe	580
ccc Pro	cca Pro 190	aaa Lys	ccc Pro	aag Lys	gac Asp	acc Thr 195	ctc Leu	atg Met	atc Ile	tcc Ser	cgg Arg 200	acc Thr	cct Pro	gag Glu	gtc Val	628
aca Thr 205	tgc Cys	gtg Val	gtg Val	gtg Val	gac Asp 210	gtg Val	agc Ser	cac His	gaa Glu	gac Asp 215	cct Pro	gag Glu	gtc Val	aag Lys	ttc Phe 220	676
aac Asn	tgg Trp	tac Tyr	gtg Val	gac Asp 225	ggc Gly	gtg Val	gag Glu	gtg Val	cat His 230	aat Asn	gcc Ala	aag Lys	aca Thr	aag Lys 235	ccg Pro	724
cgg Arg	gag Glu	gag Glu	cag Gln 240	tac Tyr	aac Asn	agc Ser	acg Thr	tac Tyr 245	cgt Arg	gtg Val	gtc Val	agc Ser	gtc Val 250	ctc Leu	acc Thr	772
gtc Val	ctg Leu	cac His 255	cag Gln	gac Asp	tgg Trp	ctg Leu	aat Asn 260	ggc Gly	aag Lys	gag Glu	tac Tyr	aag Lys 265	tgc Cys	aag Lys	gtc Val	820
tcc Ser	aac Asn 270	aaa Lys	gcc Ala	ctc Leu	cca Pro	tcc Ser 275	tcc Ser	atc Ile	gag Glu	aaa Lys	acc Thr 280	atc Ile	tcc Ser	aaa Lys	gcc Ala	868
aaa Lys 285	ggg Gly	cag Gln	ccc Pro	cga Arg	gaa Glu 290	cca Pro	cag Gln	gtg Val	tac Tyr	acc Thr 295	ctg Leu	ccc Pro	cca Pro	tcc Ser	cgg Arg 300	916

ES 2 436 779 T3

gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc		964
Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly		
				305					310					315			
ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	ccg		1012
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro		
			320					325					330				
gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc		1060
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser		
		335					340					345					
ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag		1108
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln		
	350					355					360						
ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	cac		1156
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His		
365					370					375					380		
tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	ggt	aaa	taatctagag					1202
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
				385					390								
gcgcgccaat	ta																1214

<210> 8

<211> 392

5 <212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 8

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

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

<210> 9
<211> 1070
<212> ADN
5 <213> homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (17) .. (1048)
<400> 9
10

tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg	52
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu	
1 5 10	
ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tgc ctc agc cag gaa atc cat gcc	100
Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala	
15 20 25	
gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag	148
Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln	
30 35 40	
tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc	196
Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys	
45 50 55 60	
aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc	244
Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser	
65 70 75	
tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc	292
Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys	
80 85 90	
atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac	340
Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr	
95 100 105	
ttc tgt gag aac gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc cca	388
Phe Cys Glu Asn Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro	
110 115 120	
ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc	436
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe	
125 130 135 140	
ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc	484
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val	
145 150 155	
aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc	532
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe	
160 165 170	
aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg	580
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro	
175 180 185	
cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc	628
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr	
190 195 200	
gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc	676
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val	
205 210 215 220	
tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc	724
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala	
225 230 235	
aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg	772
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	

ES 2 436 779 T3

240										245					250					
gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	820				
Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly					
		255					260					265								
ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	868				
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro					
	270					275					280									
gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	916				
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser					
					290					295					300					
ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	964				
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln					
				305					310					315						
ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	cac	1012				
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His					
			320					325					330							
tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	ggt	aaa	taatctagag				1058				
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
		335					340													
gcgcgccaat ta																1070				

<210> 10

<211> 344

5 <212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 10

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

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

<210> 11
 <211> 1082
 5 <212> ADN
 <213> homo sapiens
 <220>
 <221> CDS

<222> (17) .. (1060)
<400> 11

tattaggccg	gccacc	atg	gat	gca	atg	aag	aga	ggg	ctc	tgc	tgt	gtg	ctg	52
		Met	Asp	Ala	Met	Lys	Arg	Gly	Leu	Cys	Cys	Val	Leu	
		1				5					10			

ctg Leu	ctg Leu	tgt Cys 15	ggc Gly	gcc Ala	gtc Val	ttc Phe	gtt Val 20	tcg Ser	ctc Leu	agc Ser	cag Gln	gaa Glu 25	atc Ile	cat His	gcc Ala	100
gag Glu	ttg Leu 30	aga Arg	cgc Arg	ttc Phe	cgt Arg	aga Arg 35	gct Ala	atg Met	aga Arg	tcc Ser	tgc Cys 40	ccc Pro	gaa Glu	gag Glu	cag Gln	148
tac Tyr 45	tgg Trp	gat Asp	cct Pro	ctg Leu	ctg Leu 50	ggt Gly	acc Thr	tgc Cys	atg Met	tcc Ser 55	tgc Cys	aaa Lys	acc Thr	att Ile	tgc Cys 60	196
aac Asn	cat His	cag Gln	agc Ser	cag Gln 65	cgc Arg	acc Thr	tgt Cys	gca Ala 70	gcc Ala	ttc Phe	tgc Cys	agg Arg	tca Ser	ctc Leu 75	agc Ser	244
tgc Cys	cgc Arg	aag Lys	gag Glu 80	caa Gln	ggc Gly	aag Lys	ttc Phe	tat Tyr 85	gac Asp	cat His	ctc Leu	ctg Leu 90	agg Arg	gac Asp	tgc Cys	292
atc Ile	agc Ser	tgt Cys 95	gcc Ala	tcc Ser	atc Ile	tgt Cys	gga Gly 100	cag Gln	cac His	cct Pro	aag Lys	caa Gln 105	tgt Cys	gca Ala	tac Tyr	340
ttc Phe	tgt Cys 110	gag Glu	aac Asn	aag Lys	ctc Leu	agg Ser 115	agc Ser	gag Glu	ccc Pro	aaa Lys	tct Ser 120	tca Ser	gac Asp	aaa Lys	act Thr	388
cac His 125	aca Thr	tgc Cys	cca Pro	ccg Pro	tgc Cys 130	cca Pro	gca Ala	cct Pro	gaa Glu	gcc Ala 135	gag Glu	ggg Gly	gca Ala	ccg Pro	tca Ser 140	436
gtc Val	ttc Phe	ctc Leu	ttc Phe	ccc Pro 145	cca Pro	aaa Lys	ccc Pro	aag Lys	gac Asp 150	acc Thr	ctc Leu	atg Met	atc Ile	tcc Ser 155	cgg Arg	484
acc Thr	cct Pro	gag Glu	gtc Val 160	aca Thr	tgc Cys	gtg Val	gtg Val	gtg Val 165	gac Asp	gtg Val	agc Ser	cac His	gaa Glu 170	gac Asp	cct Pro	532
gag Glu	gtc Val	aag Lys 175	ttc Phe	aac Asn	tgg Trp	tac Tyr	gtg Val 180	gac Asp	ggc Gly	gtg Val	gag Glu	gtg Val 185	cat His	aat Asn	gcc Ala	580
aag Lys	aca Thr 190	aag Lys	ccg Pro	cgg Arg	gag Glu	gag Glu 195	cag Gln	tac Tyr	aac Asn	agc Ser	acg Thr 200	tac Tyr	cgt Arg	gtg Val	gtc Val	628
agc Ser 205	gtc Val	ctc Leu	acc Thr	gtc Val	ctg Leu 210	cac His	cag Gln	gac Asp	tgg Trp	ctg Leu 215	aat Asn	ggc Gly	aag Lys	gag Glu	tac Tyr 220	676
aag Lys	tgc Cys	aag Lys	gtc Val	tcc Ser 225	aac Asn	aaa Lys	gcc Ala	ctc Leu	cca Pro 230	tcc Ser	tcc Ser	atc Ile	gag Glu	aaa Lys 235	acc Thr	724
atc Ile	tcc Ser	aaa Lys	gcc Ala 240	aaa Lys	ggg Gly	cag Gln	ccc Pro	cga Arg 245	gaa Glu	cca Pro	cag Gln	gtg Val	tac Tyr 250	acc Thr	ctg Leu	772
ccc Pro	cca Pro	tcc Ser 255	cgg Arg	gat Asp	gag Glu	ctg Leu 260	acc Lys	aag Lys	aac Asn	cag Gln	gtc Val	agc Ser 265	ctg Leu	acc Thr	tgc Cys	820
ctg Leu	gtc Val 270	aaa Lys	ggc Gly	ttc Phe	tat Tyr	ccc Pro 275	agc Ser	gac Asp	atc Ile	gcc Ala	gtg Val 280	gag Glu	tgg Trp	gag Glu	agc Ser	868

ES 2 436 779 T3

aat	ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	916
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
285					290					295					300	
tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	964
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
				305					310					315		
agg	tgg	cag	cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	1012
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	
			320					325					330			
ctg	cac	aac	cac	tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	ggt	aaa	1060
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	
		335					340					345				
taatctagag gcgcgccaat ta																1082

<210> 12

<211> 348

5 <212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 12

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

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 180 185 190
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 195 200 205
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 210 215 220
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 225 230 235 240
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 245 250 255
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 260 265 270
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 275 280 285
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 290 295 300
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 305 310 315 320
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 325 330 335
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340 345

<210> 13

<211> 1109

5 <212> ADN

<213> homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (17) .. (1090)

10 <400> 13

ES 2 436 779 T3

tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg	52
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu	
1 5 10	
ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc	100
Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala	
15 20 25	
gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag	148
Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln	
30 35 40	
tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc	196

Tyr 45	Trp	Asp	Pro	Leu	Leu 50	Gly	Thr	Cys	Met	Ser 55	Cys	Lys	Thr	Ile	Cys 60	
aac Asn	cat His	cag Gln	agc Ser	cag Gln 65	cgc Arg	acc Thr	tgt Cys	gca Ala	gcc Ala 70	ttc Phe	tgc Cys	agg Arg	tca Ser	ctc Leu 75	agc Ser	244
tgc Cys	cgc Arg	aag Lys	gag Glu 80	caa Gln	ggc Gly	aag Lys	ttc Phe	tat Tyr 85	gac Asp	cat His	ctc Leu	ctg Leu	agg Arg 90	gac Asp	tgc Cys	292
atc Ile	agc Ser	tgt Cys 95	gcc Ala	tcc Ser	atc Ile	tgt Cys	gga Gly 100	cag Gln	cac His	cct Pro	aag Lys	caa Gln 105	tgt Cys	gca Ala	tac Tyr	340
ttc Phe	tgt Cys 110	gag Glu	aac Asn	aag Lys	ctc Leu	agg Arg 115	agc Ser	cca Pro	gtg Val	aac Asn	ctt Leu 120	cca Pro	cca Pro	gag Glu	ctc Leu	388
agg Arg 125	gag Glu	ccc Pro	aaa Lys	tct Ser	tca Ser 130	gac Asp	aaa Lys	act Thr	cac His	aca Thr 135	tgc Cys	cca Pro	ccg Pro	tgc Cys	cca Pro 140	436
gca Ala	cct Pro	gaa Glu	gcc Ala	gag Glu 145	ggg Gly	gca Ala	ccg Pro	tca Ser	gtc Val 150	ttc Phe	ctc Leu	ttc Phe	ccc Pro	cca Pro 155	aaa Lys	484
ccc Pro	aag Lys	gac Asp	acc Thr 160	ctc Leu	atg Met	atc Ile	tcc Ser	cgg Arg 165	acc Thr	cct Pro	gag Glu	gtc Val	aca Thr 170	tgc Cys	gtg Val	532
gtg Val	gtg Val	gac Asp 175	gtg Val	agc Ser	cac His	gaa Glu	gac Asp 180	cct Pro	gag Glu	gtc Val	aag Lys	ttc Phe 185	aac Asn	tgg Trp	tac Tyr	580
gtg Val	gac Asp 190	ggc Gly	gtg Val	gag Glu	gtg Val	cat His 195	aat Asn	gcc Ala	aag Lys	aca Thr	aag Lys 200	ccg Pro	cgg Arg	gag Glu	gag Glu	628
cag Gln 205	tac Tyr	aac Asn	agc Ser	acg Thr	tac Tyr 210	cgt Arg	gtg Val	gtc Val	agc Ser	gtc Val 215	ctc Leu	acc Thr	gtc Val	ctg Leu	cac His 220	676
cag Gln	gac Asp	tgg Trp	ctg Leu	aat Asn 225	ggc Gly	aag Lys	gag Glu	tac Tyr	aag Lys 230	tgc Cys	aag Lys	gtc Val	tcc Ser	aac Asn 235	aaa Lys	724
gcc Ala	ctc Leu	cca Pro	tcc Ser 240	tcc Ser	atc Ile	gag Glu	aaa Lys	acc Thr 245	atc Ile	tcc Ser	aaa Lys	gcc Ala 250	aaa Lys 250	ggg Gly	cag Gln	772
ccc Pro	cga Arg	gaa Glu 255	cca Pro	cag Gln	gtg Val	tac Tyr 260	acc Thr	ctg Leu	ccc Pro	cca Pro	tcc Ser	cgg Arg 265	gat Asp	gag Glu	ctg Leu	820
acc Thr 270	aag Lys	aac Asn	cag Gln	gtc Val	agc Ser	ctg Leu 275	acc Thr	tgc Cys	ctg Leu	gtc Val	aaa Lys 280	ggc Gly	ttc Phe	tat Tyr	ccc Pro	868
agc Ser 285	gac Asp	atc Ile	gcc Ala	gtg Val	gag Glu 290	tgg Trp	gag Glu	agc Ser	aat Asn	ggg Gly 295	cag Gln	ccg Pro	gag Glu	aac Asn 300	aac Asn 300	916
tac Tyr	aag Lys	acc Thr	acg Thr	cct Pro 305	ccc Pro	gtg Val	ctg Leu	gac Asp	tcc Ser 310	gac Asp	ggc Gly	tcc Ser	ttc Phe	ttc Phe 315	ctc Leu	964
tac Tyr	agc Ser	aag Lys	ctc Leu	acc Thr	gtg Val	gac Asp	aag Lys	agc Ser	agg Arg	tgg Trp	cag Gln	cag Gln	ggg Gly	aac Asn	gtc Val	1012

ES 2 436 779 T3

			320					325				330					
ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	cac	tac	acg	cag		1060
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln		
		335					340					345					
aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	ggt	aaa	taa	tctagaggcg	cgccaatta						1109
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
	350					355											

<210> 14
 <211> 357
 5 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 14

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 210 215 220
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser
 225 230 235 240
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 245 250 255
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 260 265 270
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 275 280 285
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 290 295 300
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 305 310 315 320
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 325 330 335
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 340 345 350
 Leu Ser Pro Gly Lys
 355

<210> 15

<211> 29

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de cebador

<400> 15

10

tattaggcog gccaccatgg atgcaatga 29

<210> 16

<211> 29

15 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de cebador

<400> 16

20

tgaagatttg ggctccttga gacctggga 29

<210> 17
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 5 <220>
 <223> secuencia de cebador
 <400> 17

 tcccaggtct caaggagccc aaatcttca 29
 10
 <210> 18
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 15 <220>
 <223> secuencia de cebador
 <400> 18

 taattggcgc gcccttagat tattaccog gagaca 36
 20
 <210> 19
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 25 <220>
 <223> secuencia de cebador
 <400> 19

 tgaagatttg ggctogttct cacagaagta 30
 30
 <210> 20
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de cebador
 <400> 20

 atactctgt gagaacgagc ccaaatcttc a 31
 40
 <210> 21
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de cebador
 <400> 21

 ttgggctcg cctcgagct tttctcaca 30
 50
 <210> 22
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 55 <220>
 <223> secuencia de cebador
 <400> 22

ctcaggagcg agcccaaatttcagaca 28

<210> 23
5 <211> 26
<212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>
<223> secuencia de cebador
10 <400> 23

tttgggtcc ctgagctctg gtggaa 26

<210> 24
15 <211> 28
<212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>
<223> secuencia de cebador
20 <400> 24

gagctcaggg agcccaaatttcagaca 28

<210> 25
25 <211> 35
<212> PRT
<213> secuencia artificial
<220>
<223> secuencia de péptido señal modificado
30 <400> 25

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu cys cys Val Leu Leu Leu cys Gly
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
20 25 30

Phe Arg Arg
35

REIVINDICACIONES

1. Una formulación que comprende:
 - 5 a) Proteína de fusión TACI-inmunoglobulina (TACI-Ig) que comprende:
 - i. el dominio extracelular de TACI o un fragmento o una variante del mismo que se une a BlyS y/o APRIL; y
 - ii. un dominio constante de inmunoglobulina;
 - 10 b) un tampón de acetato que tampona la formulación a un pH en el intervalo entre 4,9 y 5,1; y
 - c) trealosa en una concentración en el intervalo de 600 a 100 mg/ml.
- 15 2. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho tampón de acetato está en una concentración de 5 a 25 mM.
3. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho tampón de acetato está en una concentración 10 mM.
- 20 4. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho tampón de acetato es tampón de acetato sódico.
5. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene un pH de 25 5,0.
6. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la trealosa está en una concentración de 80 mg/ml.
- 30 7. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha proteína de fusión TACI-Ig está comprendida en una concentración entre 20 y 180 mg/ml.
8. La formulación de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicha proteína de fusión TACI-Ig está en una concentración de 70, 75, 100, 125 ó 150 mg/ml.
- 35 9. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho fragmento del dominio extracelular de TACI comprende los restos de aminoácidos de 34 a 66 y/o los restos de aminoácidos de 71 a 104 de la SEQ ID NO: 1.
- 40 10. La formulación de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicho fragmento del dominio extracelular de TACI comprende los restos de aminoácidos de 30 a 110 de la SEQ ID NO: 1, o una variante de los mismos que son al menos 90% idénticos a los mismos, o que tienen menos de 10 sustituciones de aminoácidos conservativas, uniéndose la variante a BlyS y/o APRIL.
- 45 11. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho dominio constante de inmunoglobulina comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 o una variante de la misma que comprende menos de 20 sustituciones de aminoácidos conservativas.
12. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha proteína de fusión TACI-Ig comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3, o una variante de la misma que es al menos 90% idéntica a la misma, o que tiene menos de 30 sustituciones de aminoácidos conservativas, uniéndose la variante a BlyS y/o APRIL.
- 50 13. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende una combinación de alcohol bencílico y cloruro de benzalconio.
14. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la formulación está en forma líquida.

15. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la formulación es para la administración de múltiples dosis.

16. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la
5 formulación comprende:

dicha proteína de fusión TACI-Ig en una concentración comprendida entre 70 y 180 mg/ml;
trealosa en una concentración comprendida entre 60 y 100 mg/ml; y
10 tampón de acetato sódico en una concentración 10 mM.

17. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para usar en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad linfoproliferativa.

18. Un procedimiento para preparar la formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a
15 16, que comprende la etapa de mezclar la proteína de fusión TACI-Ig, tampón de acetato y trealosa en una concentración en el intervalo de 60 a 100 mg/ml, y ajustar el pH en el intervalo de 4,9 a 5,1.

19. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, que además comprende la etapa de poner una cantidad predeterminada de la formulación en un recipiente estéril.

20. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el recipiente estéril se selecciona de un vial de vidrio o una jeringa precargada.