

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 833**

51 Int. Cl.:

| | |
|-------------------|-----------|
| A61K 38/00 | (2006.01) |
| A61P 31/00 | (2006.01) |
| A61K 38/48 | (2006.01) |
| A61K 38/55 | (2006.01) |
| A61K 38/16 | (2006.01) |
| A61K 38/57 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2014 PCT/US2014/030309**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14145519**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2014 E 14762343 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2968434**

54 Título: **Composiciones C1-INH para uso en la prevención y tratamiento del angioedema hereditario (AEH)**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361791399 P

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

30.10.2017

73 Titular/es:

**SHIRE VIROPHARMA INCORPORATED (100.0%)
300 Shire Way
Lexington MA 02421, US**

72 Inventor/es:

**GALLAGHER, CYNTHIA;
RUDDY, STEPHEN y
MANNING, MARK, CORNELL**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 639 833 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).

Composiciones C1-INH para uso en la prevención y tratamiento del angioedema hereditario (AEH)**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere al campo de los agentes terapéuticos y métodos de uso de los mismos. Específicamente, la presente invención proporciona composiciones para el tratamiento y/o prevención de trastornos asociados con la deficiencia de inhibidor de esterasa C1.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Varias publicaciones y documentos de patente se citan en toda la memoria con el fin de describir el estado de la técnica a la que pertenece esta invención. Las citas completas de estas referencias se pueden encontrar en toda la memoria.

15

El angioedema hereditario (AEH) es un trastorno raro, genético, que amenaza la vida, causado por una deficiencia del inhibidor de esterasa C1 (véase, en general, www.haei.org y www.haea.org). Al menos 6.500 personas en los Estados Unidos y al menos 10.000 personas en Europa tienen AEH. Pacientes con AEH experimentan ataques recurrentes, debilitantes, que amenazan la vida impredecibles de la inflamación y la hinchazón submucosa/subcutánea. La inflamación es normalmente de la laringe, el abdomen, la cara, las extremidades y el tracto urogenital. Este trastorno genético es el resultado de un defecto en el gen que controla la síntesis del inhibidor de la esterasa C1. De acuerdo con ello, la restauración de los niveles de inhibidor de esterasa C1 activa en estos pacientes a o cerca de los niveles normales es una medida eficaz para el tratamiento de AEH. Sin embargo, se desean nuevos y mejores métodos de tratamiento y prevención de trastornos asociados con una deficiencia del inhibidor de esterasa C1, tal como AEH.

20

25

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención es como se define en las reivindicaciones 1-13 y proporciona una composición que comprende al menos un inhibidor de la esterasa C1 en el que al menos el inhibidor de la esterasa C1 está presente en 400 U/ml o más para su uso en el tratamiento, inhibición, o prevención de angioedema hereditario (AEH) y en el que dicha composición se administra por vía subcutánea.

30

35 BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 proporciona una secuencia de aminoácidos de inhibidor de la esterasa C1 humano.

La Figura 2 proporciona un gráfico del efecto de la concentración de proteínas en la viscosidad para muestras de concentración inicial de giro.

40

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La restauración de los niveles de inhibidor de esterasa C1 activa en pacientes que tienen un trastorno asociado con niveles deficientes o reducidos de inhibidor de la esterasa C1 activa (por ejemplo, AEH) es una medida eficaz para el tratamiento de tales trastornos. Actualmente, inhibidor de la esterasa C1 (tales como Cinryze® (ViroPharma, Inc.; Exton, PA)) se administra a un paciente por vía intravenosa por un profesional médico. En la presente memoria, las formulaciones de un inhibidor de la esterasa C1 (tales como Cinryze®) se proporcionan que también son eficaces para administración subcutánea (SC). Sorprendentemente, la administración subcutánea del inhibidor de la esterasa C1 es suficiente para mantener los niveles en sangre del inhibidor de la esterasa C1. La administración SC de un inhibidor de esterasa C1 cumple una necesidad médica no satisfecha debido a las limitaciones de la administración intravenosa en pacientes con AEH.

45

50

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan composiciones para el uso en métodos para inhibir (por ejemplo, reducir o ralentizar), tratar y/o prevenir un trastorno asociado con la deficiencia de Inhibidor de la esterasa C1 en un sujeto. En una realización particular, los procedimientos comprenden la administración (por vía subcutánea) a un sujeto en necesidad del mismo de al menos un inhibidor de la esterasa C1. En una realización particular, el inhibidor de la esterasa C1 es administrado por vía subcutánea después de una administración inicial del inhibidor de esterasa C1 por vía intravenosa.

55

60

65

Inhibidores de la esterasa C1 también se conocen como inhibidores de C1 (C1 INH). Inhibidores de la esterasa C1 son inhibidores de complemento C1 y pertenecen a la superfamilia de inhibidores de proteínasa de serina. El inhibidor de la esterasa C1 humana es una proteína de 500 aminoácidos, incluyendo una secuencia de señal de 22 aminoácidos (Carter et al. (1988) Eur J. Biochem., 173: 163). En el plasma, el inhibidor de la esterasa C1 es una glicoproteína fuertemente glicosilada de aproximadamente 76 kDa (Perkins et al. (1990) J. Mol Biol, 214: 751). La actividad de un inhibidor de la esterasa C1 puede ensayarse por métodos conocidos (véase, por ejemplo, Drouet et al. (1988) Clin Chim Acta, 174: 121-30). En una realización particular, el inhibidor de la esterasa C1 es

humano. Una secuencia de aminoácidos de inhibidor de esterasa C1 humana se proporciona en GenBank N° de acceso CAA30314 (véase también ID de gen: 710, que también proporciona secuencias de nucleótidos del inhibidor de la esterasa C1) y la Figura 1. Un inhibidor de la esterasa C1 para uso en los métodos de la invención instantánea puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99, o 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la Figura 1. El inhibidor de la esterasa C1 puede ser aislado o purificado a partir de plasma (por ejemplo, plasma humano) o producido de forma recombinante. Cuando purificado a partir de plasma, el inhibidor de la esterasa C1 puede ser nanofiltrado y pasteurizado. En una realización particular, el inhibidor de esterasa C1 derivado de plasma es Cinryze®. En una realización particular, el inhibidor de la esterasa C1 está presente en las composiciones de la presente invención en una concentración elevada. De hecho, las composiciones que comprenden niveles muy altos de inhibidor de la esterasa C1 se han determinado a ser sorprendentemente estables y activas. En una realización particular, el inhibidor de la esterasa C1 está presente en 400 U/ml a 500 U/ml.

En una realización particular, las composiciones de la presente invención no contienen citrato o ácido cítrico. Las composiciones que carecen de ácido citrato y ácido cítrico son particularmente útiles para la administración subcutánea del inhibidor de la esterasa C1 como citrato/ácido cítrico puede causar una reacción en el lugar de inyección. En una realización particular, la memoria intermedia de las presentes composiciones es fosfato de sodio (por ejemplo, aproximadamente 5 mM a fosfato de sodio aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM de fosfato de sodio, o alrededor de 20 mM de fosfato de sodio). En una realización particular, la memoria intermedia de las presentes composiciones comprende un grupo carboxílico. Por ejemplo, el tampón puede ser, sin limitación, citrato, succinato, tartrato, maleato, acetato, y sales de los mismos. En una realización particular, la memoria intermedia de la presente composición es el citrato de sodio o citrato (por ejemplo, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM de citrato de sodio, aproximadamente 10 mM a citrato de sodio aproximadamente 30 mM, o alrededor de 20 mM de citrato sódico).

Las composiciones de la presente invención pueden tener un intervalo de pH de aproximadamente 6,5 o superior, en particular aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,0, en particular aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5, y más particularmente aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,0.

Las composiciones de la presente invención también pueden comprender polisorbato 80 (TWEEN). Composiciones que comprenden polisorbato 80 son particularmente útiles, ya que reducen/mitigan la agregación de proteínas. Polisorbato 80 también puede limitar las interacciones de proteína cuando la composición entra en contacto con lubricantes/aceites que contienen silicio, tales como los utilizados en las jeringas y otros dispositivos de administración. Las composiciones que comprenden polisorbato 80 también son útiles para las preparaciones liofilizadas. En una realización particular, el polisorbato 80 está presente a una concentración de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,1%, en particular de aproximadamente 0,025% a aproximadamente 0,075%, particularmente aproximadamente 0,05%.

Las composiciones de la presente invención también pueden comprender sacarosa. La sacarosa puede añadirse como un agente de "volumen", así como un lio-protector. En una realización particular, se añade sacarosa a composiciones a liofilizar. En una realización particular, las composiciones comprenden de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 125 mM de sacarosa, en particular de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 100 mM de sacarosa.

Las composiciones de la presente invención también pueden comprender al menos un aminoácido o sal del mismo, en particular metionina y/o arginina. La arginina tiene una carga positiva en su cadena lateral que se puede utilizar para amortiguar soluciones con fosfato. La metionina actúa como un estabilizador (por ejemplo, mediante la limitación de la oxidación). Los aminoácidos pueden estar presentes en la composición como aminoácidos individuales o presentes como péptidos cortos (por ejemplo, 2 a aproximadamente 5 aminoácidos, en particular di-péptidos o tri-péptidos).

Como se ha indicado anteriormente, la presente descripción abarca composiciones para su uso en métodos de tratamiento, inhibición, y/o prevención de cualquier condición o enfermedad asociada con una deficiencia absoluta o relativa de inhibidor de esterasa C1 funcional. Tales trastornos incluyen, sin limitación, angioedema adquirida (AAE) y angioedema hereditario (AEH). En la invención, el trastorno es AEH y/o los ataques asociados con el mismo. Como se ha indicado anteriormente, AEH es una enfermedad que amenaza la vida y debilitante que se manifiesta como recurrente, ataques de hinchazón submucoso/subcutáneo debido a una deficiencia de inhibidor de la esterasa C1 (Zuraw, BL (2008) N. Engl J. Med, 359: 1027 -1036). En una realización particular, el angioedema hereditario es de tipo I o de tipo II. Tanto tipo I como tipo II tienen un gen defectuoso para la síntesis de inhibidor de esterasa C1 que producen ya sea ningún inhibidor C1 (AEH tipo I), ya sea un inhibidor de C1 disfuncional (AEH tipo II) (Rosen et al. (1965) Science 148: 957 -958; Bissler et al. (1997) Proc Assoc Am Physicians 109: 164-173; Zuraw et al. (2000) J. Allergy Clin Immunol 105: 541-546; Bowen et al. (2001). Clin Immunol. 98: 157-163).

Las composiciones para uso de acuerdo con la presente invención abarcan la administración de al menos un inhibidor de la esterasa C1, tal como se define en las reivindicaciones. Las composiciones que comprenden al menos un inhibidor de la esterasa C1 y, opcionalmente, al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable (por

ejemplo, uno adecuado para la administración subcutánea o intravenosa) están abarcados por la presente invención como se define en las reivindicaciones. Tales composiciones se pueden administrar, en una cantidad terapéuticamente eficaz, a un paciente en necesidad del mismo para el tratamiento de un trastorno asociado con la deficiencia de inhibidor de esterasa C1. La presente descripción también abarca kits que comprenden al menos una composición de la presente invención, por ejemplo, que comprende una composición de al menos un inhibidor de la esterasa C1 y, opcionalmente, al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, uno adecuado para la administración intravenosa o subcutánea) como se define en las reivindicaciones. Los kits pueden comprender además al menos uno de tampón de la reconstitución, jeringas (por ejemplo, desechables) para administración parenteral (por ejemplo, subcutánea) de inyección, y el material de instrucciones. En un aspecto particular, el kit comprende al menos una jeringa pre-cargada que comprende el inhibidor de la esterasa C1 y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, una jeringa puede ser cargada con inhibidor de esterasa C1 al menos una con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración (por ejemplo, la administración intravenosa o subcutánea). Alternativamente, una sola jeringa puede ser cargada con inhibidor de la esterasa C1 liofilizada. En un aspecto particular, las jeringas precargadas tienen una composición farmacéutica que contiene polisorbato 80 como componente (por ejemplo, en una cantidad que previene la interacción proteína-silicona o la agregación de proteínas).

Los agentes y composiciones de la presente divulgación se pueden administrar por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyección (por ejemplo, para la administración local (directa) o sistémica. En la invención, la composición se administra subcutáneamente de acuerdo con la invención. En general, el vehículo farmacéuticamente aceptable de la composición se selecciona del grupo de diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o vehículos. Las composiciones pueden incluir diluyentes de diverso contenido de tampón (por ejemplo, Tris HC1, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica; y aditivos tales como detergentes y agentes solubilizantes (por ejemplo, Tween 80, Polisorbato 80), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito sódico), conservantes (por ejemplo, Thimersol, alcohol bencílico) y sustancias de aumento de volumen (por ejemplo, lactosa, manitol). La composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar, por ejemplo, en forma líquida, o puede estar en forma de polvo seco (por ejemplo, liofilizada para su reconstitución posterior).

En una realización particular, las composiciones se formulan en forma liofilizada. Cuando las composiciones se proporcionan en forma liofilizada, las composiciones se reconstituyen antes de su uso (por ejemplo, dentro de una hora, horas, o días o más de uso) por un tampón apropiado (por ejemplo, agua estéril, una solución salina estéril, o una solución estéril que comprende los portadores farmacéuticamente aceptables apropiados (por ejemplo, para reconstituir las composiciones como se ha descrito anteriormente en este documento). El tampón (de la reconstitución puede ser proporcionado en los kits de la presente descripción o se pueden obtener o proporcionar por separado).

Tal como se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión y similares que pueden ser apropiados para la ruta de administración deseada de la preparación farmacéutica, como se ejemplifica en el párrafo anterior. El uso de tales medios para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional es incompatible con las moléculas que han de administrarse, se contempla su uso en la preparación farmacéutica.

La selección de una preparación farmacéutica adecuada depende del método de administración elegida. En este caso, una preparación farmacéutica comprende las moléculas dispersas en un medio que es compatible con el tejido al que se está administrando. Los métodos para preparar parenteralmente o administrar por vía subcutánea composiciones son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA)).

Tal como se ha indicado anteriormente, los agentes de la presente divulgación se administran parenteralmente - por ejemplo por inyección intravenosa en el torrente sanguíneo y/o por inyección subcutánea. Las preparaciones farmacéuticas para administración parenteral, intravenosa y subcutánea son conocidas en la técnica. Si se selecciona la inyección parenteral como un procedimiento para la administración de las moléculas, se deben tomar medidas para asegurar que suficientes cantidades de las moléculas alcancen sus células diana para ejercer un efecto biológico.

Las composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto de la presente invención como el ingrediente activo en mezcla íntima con un vehículo farmacéutico pueden prepararse de acuerdo con técnicas de composición farmacéutica convencional. El vehículo puede tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración (subcutánea). Para parenterales, el vehículo comprenderá normalmente agua estéril, aunque otros ingredientes, por ejemplo, ayudan a la solubilidad o con fines conservantes, pueden ser incluidos. Las suspensiones inyectables también se pueden preparar, en cuyo caso portadores líquidos apropiados, agentes de suspensión y similares pueden ser empleados.

Una preparación farmacéutica de la invención se puede formular en forma de dosis unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma de dosificación unitaria, como se usa en el presente

documento, se refiere a una unidad físicamente discreta de la preparación farmacéutica adecuada para el paciente sometido a tratamiento. Cada dosis debe contener una cantidad de ingrediente activo calculada para producir el efecto deseado en asociación con el vehículo farmacéutico seleccionado. Las unidades de dosificación pueden aumentarse proporcionalmente o disminuirse en base al peso del paciente. Las concentraciones apropiadas para el alivio de un estado patológico particular, se pueden determinar por cálculos de la curva de concentración de dosificación. Unidad de dosificación adecuada también se puede determinar mediante la evaluación de la eficacia del tratamiento.

La preparación farmacéutica que comprende las moléculas de la presente invención se puede administrar a intervalos apropiados, por ejemplo, a diario, cada dos días, cada tres días, cinco de cada 7 días, o al menos uno, dos o tres veces a la semanas o más hasta que los síntomas patológicos se reducen o alivian, tras lo cual la dosis puede ser reducida a un nivel de mantenimiento. El intervalo adecuado en un caso particular normalmente dependería de la condición del paciente.

En una realización particular, el inhibidor de la esterasa C1 está presente en la composición o se administra en el intervalo de aproximadamente 100 unidades a aproximadamente 10.000 unidades; aproximadamente 500 unidades a aproximadamente 5.000 unidades; aproximadamente 1000 unidades a aproximadamente 3.500 unidades, o aproximadamente 1500 unidades a aproximadamente 2.500 unidades. En una realización particular, se utiliza al menos aproximadamente 2.000 unidades. En una realización particular, una dosis inicial alta del inhibidor de la esterasa C1 (como se indica más arriba (se puede administrar por vía intravenosa)) se utiliza, seguida de dosis de mantenimiento más bajas. Por ejemplo, la dosis inicial alta puede ser al menos 1,5, 2, 3, 4, o 5 veces las dosis posteriores. En una realización particular, el inhibidor de la esterasa C1 está presente en la composición de mantenimiento o se administra para el mantenimiento en el intervalo de aproximadamente 100 unidades a aproximadamente 5.000 unidades; aproximadamente 250 unidades a aproximadamente 2.000 unidades; aproximadamente 250 unidades a aproximadamente 1.000 unidades; o aproximadamente 500 unidades. La dosis inicial alta del inhibidor de la esterasa C1 es opcional en los métodos de la invención reivindicada (por ejemplo, puede ser opcional con métodos profilácticos).

En una realización particular, el inhibidor de la esterasa C1 se administra con una frecuencia y dosificación a fin de aumentar el nivel de inhibidor de la esterasa C1 a al menos aproximadamente 0,3 o, más particularmente, 0,4 U/ml o más hasta aproximadamente 1 U/ml (1 unidad/ml es la cantidad media de inhibidor de C1 presente en 1 ml de plasma humano normal) en la sangre del sujeto. Por ejemplo, el nivel de inhibidor de la esterasa C1 puede mantenerse a o por encima de 0,4 U/ml durante al menos 50%, al menos 75%, al menos 90%, al menos 95% o más del tiempo o todo el tiempo (por ejemplo, el tiempo durante el cual se está administrando fármaco). Por ejemplo, la administración de una dosis inicial de 2000U de inhibidor de la esterasa C1 seguido de 250U cotidianamente o 500U cada dos días resulta en el mantenimiento de justo por debajo de 0,4 U/ml en la sangre. Además, la administración de una dosis inicial de 2000U de inhibidor de la esterasa C1, seguido de 1000 U cada 3 días resulta en el mantenimiento de aproximadamente 0,4 U/ml en la sangre. En particular, para facilidad de uso por el paciente, pueden ser preferibles las administraciones menos frecuentes. La administración de una dosis inicial de 2000U de inhibidor de esterasa C1 seguido por 500U todos los días con las vacaciones de fin de semana de la administración (es decir, 5 de los 7 días) también resulta en el mantenimiento de aproximadamente 0,4 U/ml o superior en la sangre. Notablemente, la administración de sólo las dosis de mantenimiento conduce a un aumento y los niveles en sangre fisiológicamente pertinentes del inhibidor de la esterasa C1, pero se retrasó en comparación con los que recibieron una dosis alta inicial.

Definiciones

Las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" puede referirse a $\pm 5\%$, $\pm 2\%$, o $\pm 1\%$.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "huésped", "sujeto" y "paciente" se refieren a cualquier animal, incluyendo seres humanos.

Tal como se utiliza aquí, el término "prevenir" se refiere al tratamiento profiláctico de un sujeto que está en riesgo de desarrollar una condición (por ejemplo, AEH o ataque AEH), resultando en una disminución en la probabilidad de que el sujeto va a desarrollar la condición.

El término "tratar" como se usa aquí se refiere a cualquier tipo de tratamiento que imparte un beneficio a un paciente aquejado de un trastorno, incluyendo la mejora en la condición del paciente (por ejemplo, en uno o más síntomas), retraso en la progresión de la enfermedad, etc. en una realización particular, el tratamiento de AEH resulta en al menos una reducción en la gravedad y/o el número de ataques de AEH.

La frase "cantidad eficaz" se refiere a esa cantidad de agente terapéutico que se traduce en una mejora en

la condición del paciente. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto o una composición farmacéutica se refiere a una cantidad eficaz para prevenir, inhibir, tratar o disminuir los síntomas de un trastorno o enfermedad particular.

5 "Farmacéuticamente aceptable" indica la aprobación por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal o enumerado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

10 Un "vehículo" se refiere a, por ejemplo, un diluyente, adyuvante, conservante (por ejemplo, Thimersol, alcohol bencílico), anti-oxidante (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), solubilizante (por ejemplo, TWEEN 80, polisorbato 80), emulsionante, tampón (por ejemplo, Tris HCl, acetato, fosfato), agua, soluciones acuosas, aceites, sustancias de aumento de volumen (por ejemplo, lactosa, manitol), protectores crio/lyo-, modificador de la tonicidad, excipiente, agente auxiliar o vehículo con el que un agente activo de la presente invención es administrado. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, PA); Gennaro, A.R., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (Lippincott, Williams y Wilkins); Liberman, et al, eds, Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Nueva York, Nueva York; y Kibbe, et al., Eds., Handbook of Pharmaceutical Excipients, American Pharmaceutical Association, Washington.

20 El término "aislado" puede referirse a la proteína, ácido nucleico, un compuesto, o una célula que ha sido separada suficientemente del ambiente con el que estaría naturalmente asociado (por ejemplo, de forma que existen en forma "sustancialmente pura"). "Aislado" no significa necesariamente la exclusión de mezclas artificiales o sintéticas con otros compuestos o materiales, o la presencia de impurezas que no interfieren con la actividad fundamental, y que pueden estar presentes, por ejemplo, debido a una purificación incompleta.

25 El término "sustancialmente puro" se refiere a una preparación que comprende al menos 50-60% en peso de un material dado (por ejemplo, ácido nucleico, oligonucleótido, proteína, etc.). En ciertas realizaciones, la preparación comprende al menos 75% en peso, particularmente 90-95% o más en peso del compuesto dado. La pureza se mide mediante métodos apropiados para el compuesto dado (por ejemplo, métodos cromatográficos, agarosa o electroforesis en gel de poliacrilamida, análisis de HPLC, y similares).

30 Se proporciona el siguiente ejemplo para ilustrar diversas realizaciones de la presente invención. El ejemplo es ilustrativo y no pretende limitar la invención de ninguna manera.

35 EJEMPLO

Estudios de concentración de giro

40 La proteína se cargó en los concentradores de giro y se giró a 10.500 rpm durante 5 a 10 minutos. Cuando las muestras dejaron de rotarse, los volúmenes finales en los concentradores de giro se registraron y una concentración de proteína en bruto se calculó para cada uno. La proteína adicional se añadió a los concentradores de giro y se hicieron girar hasta que se alcanzó la concentración de proteína deseada, momento en el que se hizo una medición de UV. En cada concentración de proteína diana se realizó una medición de UV y de viscosidad. El procedimiento anterior continúa hasta que la viscosidad de la proteína evita que la muestra se concentre más.

45 *Mediciones de viscosidad*

50 La viscosidad se determinó midiendo la cantidad de tiempo que tardó la muestra para llevarse a una distancia predeterminada en una punta de pipeta de carga de gel. Para el cálculo de la viscosidad de la muestra, una curva estándar se preparó en primer lugar utilizando un conjunto de estándares con viscosidades conocidas. Soluciones de sacarosa (o Brix) son adecuadas para la preparación de una curva de este tipo, pero cualquier material con viscosidad conocida a una temperatura definida debe ser apropiado.

55 Con el fin de realizar una medición, el émbolo de pipeta está deprimido, la punta de pipeta se inserta en el vial de muestra, el émbolo se libera, y se midió el tiempo para que el fluido se desplace a una distancia predeterminada en la punta de pipeta con un cronómetro. La distancia utilizada para estos experimentos fue de 30 μ l de agua. Es importante notar que una punta de pipeta sólo es fiable para una sola medición, por lo que varias puntas se utilizan para hacer mediciones repetidas de una muestra. También, el volumen que se ha de introducir en la punta de pipeta debe ser mayor que el volumen marcado en la punta para asagurar una tracción uniforme sobre la muestra durante una medición. Para una marca de volumen de 30 μ L en la punta de pipeta, la micropipeta se estableció para introducir 42 μ l.

Resultados

65 El ejemplo instantáneo determinó la capacidad de desarrollar una formulación líquida de mayor concentración de C1 INH como monofarmacéutica. Los estudios iniciales se centraron en la concentración de la

solución madre de C1 INH usando un método de concentración de centrifugado. Las soluciones se ajustaron inicialmente para pH pero no se añadió ningún otro excipiente. Tres valores de pH fueron investigados (pH 5,9, 6,9, y 7,9). Tras la concentración por rotación, todas las soluciones se mantuvieron claras hasta concentraciones de hasta ~ 500 U/ml (aproximadamente 100 mg/ml) para todos los valores de pH ensayados (Tabla 1). Mientras que el límite de solubilidad no se alcanzó en estos estudios, hubo aumentos medibles en la viscosidad cuando las concentraciones superaron 300 U/ml (Figura 2). En todos los valores de pH, la viscosidad comienza a aumentarse marcadamente cuando la concentración de C1 INH sube por encima de 400 U/ml.

Tabla 1: Concentraciones finales (en U/ml) y viscosidades de las muestras preparadas durante los experimentos de concentración de centrifugado. Estos valores se basan en la concentración inicial de 160 U/ml del fármaco a granel inicial.

| 7,9 U/ml | viscosidad | 6,9 U/ml | viscosidad | 5,9 U/ml | viscosidad |
|---------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|
| 93,12 | 0,99 | 182,4 | 4,23 | 187,2 | 2,36 |
| 415,18 | 3,95 | 289,4 | 4,90 | 296,9 | 7,71 |
| 454,81 | 13,74 | 378,6 | 12,08 | 396,7 | 5,46 |
| 501,17 | 30,43 | 479,0 | 14,67 | 478,8 | 24,09 |

Un estudio de viabilidad más grande se llevó a cabo mediante el examen de diferentes tampones (20 mM de fosfato, 20 mM de citrato, y 20 mM de Tris) a cada uno de los tres valores de pH diana. Las muestras de tanto 400 U/ml como 500 U/ml se prepararon y evaluaron para la estabilidad después de una semana a 40°C y después de dos semanas a 25°C. Los niveles iniciales de viscosidad estaban bien por encima de los valores para el agua pura (~ 1 mPa-s), pero dentro de los límites establecidos por lo general para su uso como un producto inyectable (Tabla 2). Los valores de viscosidad para los 400 U/ml de muestras fueron menos que a 500 U/ml, por lo general por 7 a 10 mPa-s. Tras el almacenamiento a 40°C durante una semana, se aumentó la viscosidad de todas las muestras. A pH 5,9, se gelificaron, probablemente debido a agregación inducida térmicamente. Para las formulaciones restantes, la viscosidad se aumenta en algún grado. En algunos casos estos valores superan el 30 mPa-s. El aumento de la viscosidad fue inferior en el almacenamiento a 25°C que a 40°C. Hubo poco o ningún cambio, para las muestras a pH 6,9, indicando que pH 6,9 puede ser más favorable para la estabilidad de almacenamiento a largo plazo.

Tabla 2: Viscosidad a t0 y después de una semana de almacenamiento a 40°C (T1). La viscosidad se informó en mPa-s.

| pH | [C1 INH] | Tampón | t0 | t1 | t2 |
|-----|----------|-----------|------------|------------|------------|
| 5,9 | 400 | fosfato | 13,3 ± 0,6 | gel | 17,4 ± 2,1 |
| | 500 | | 24,6 ± 1,5 | gel | 36,9 ± 7,3 |
| | 400 | histidina | 14,7 ± 0,8 | gel | 19,1 ± 2,5 |
| | 500 | | 27,7 ± 3,8 | gel | 27,7 ± 3,8 |
| 6,9 | 400 | fosfato | 12,2 ± 1,5 | 16,1 ± 0,6 | 11,9 ± 3,0 |
| | 500 | | 20,8 ± 2,0 | 35,3 ± 2,1 | 32,1 ± 7,7 |
| | 400 | citrato | 7,4 ± 0,8 | 9,2 ± 0,7 | 7,1 ± 0,6 |
| | 500 | | 14,4 ± 3,2 | 19,8 ± 1,1 | 12,6 ± 0,5 |
| 7,9 | 400 | fosfato | 8,2 ± 1,2 | 12,8 ± 0,7 | 22,0 ± 3,5 |
| | 500 | | 16,2 ± 1,4 | 23,1 ± 2,1 | 25,5 ± 7,5 |
| | 400 | tris | 14,1 ± 0,7 | 18,7 ± 0,7 | 30,0 ± 3,8 |
| | 500 | | 20,5 ± 0,9 | 33,3 ± 6,2 | 31,0 ± 1,8 |

En particular, a pH 6,9, las formulaciones de citrato tenían valores de viscosidad más bajos que para el fosfato, mientras que a pH 7,9, el tampón de fosfato produce viscosidades más bajas que el tampón de tris. Viscosidades más altas significarán que se requerirá una mayor fuerza para suministrar un volumen especificado de la droga dentro de un cierto marco de tiempo.

La pureza por RP HPLC fue inicialmente de aproximadamente 86 al 87% para las formulaciones a pH 6,9 y más (Tabla 3). Los niveles iniciales fueron inferiores a pH 5,9, lo que sugiere que alguna degradación ya había ocurrido sólo en el proceso de preparación de las muestras. Tras el almacenamiento durante una semana a 40°C, las muestras de pH 5,9 se gelificaron, haciendo imposible el análisis por RP HPLC. Para todas las otras muestras, el porcentaje de pureza era esencialmente sin cambios, lo que indica que poca, o ninguna degradación química se produce para el almacenamiento en estas condiciones.

Tabla 3: Porcentaje de pureza por RP HPLC tras el almacenamiento a 25°C (T2) o 40°C (T1).

| pH | [C1 INH] | Tampón t0 | | t1 | t2 |
|-----|----------|-----------|--------------|--------------|--------------|
| 5,9 | 400 | fosfato | 82,87 ± 0,75 | gel | 81,10 ± 2,11 |
| | 500 | | 84,74 ± 1,24 | gel | 83,61 ± 1,02 |
| | 400 | histidina | 84,11 ± 1,53 | gel | 85,34 ± 1,55 |
| | 500 | | 86,36 ± 0,76 | gel | 82,99 ± 0,64 |
| 6,9 | 400 | fosfato | 87,14 ± 0,67 | 88,59 ± 0,29 | 85,19 ± 2,00 |
| | 500 | | 86,44 ± 1,49 | 85,65 ± 1,32 | 84,07 ± 1,24 |
| | 400 | citrato | 86,67 ± 1,36 | 82,92 ± 1,48 | 86,03 ± 0,87 |
| | 500 | | 86,89 ± 1,24 | 86,74 ± 0,88 | 84,42 ± 1,19 |
| 7,9 | 400 | fosfato | 86,09 ± 1,14 | 85,29 ± 0,84 | 85,98 ± 0,90 |
| | 500 | | 86,47 ± 1,15 | 83,57 ± 1,33 | 84,00 ± 0,97 |
| | 400 | tris | 87,14 ± 0,98 | 81,74 ± 7,89 | 86,14 ± 0,81 |
| | 500 | | 88,74 ± 0,82 | 87,24 ± 1,47 | 87,30 ± 0,95 |

Para las muestras almacenadas durante dos semanas a 25°C, había pequeñas pérdidas, comparables a lo que se vio en t1. Juntos, los datos de RP HPLC indican que hay pequeñas pérdidas debido a la degradación química. pH más alto parece disminuir la velocidad de degradación y puede haber cierta sensibilidad a composición de tampón.

Mientras que la estabilidad química de C1 INH parece estar sin cambios durante el almacenamiento, hay cierta inestabilidad física observada como se indica por SEC (Tabla 4). Hay otras proteínas presentes en la mezcla de C1 INH, conduciendo a un 'pureza' general de aproximadamente ~ 67% en t0. Tras el almacenamiento a 40°C durante una semana (t1), el contenido total de monómeros de las muestras se redujo a 54-56% para las muestras con pH 6,9 y superior. Hubo poca diferencia entre las dos condiciones de pH diferentes, los diferentes tampones y las dos concentraciones de proteína. Cuando se almacenan durante dos semanas a 25°C (t2), las muestras de pH 5,9 no se gelificaron, como lo hicieron en la temperatura de almacenamiento superior. Sin embargo, hubo apreciablemente mayor degradación, especialmente con tampón de histidina. A pH 6,9 o 7,9, la pérdida medida por SEC fue de aproximadamente 2% o menos, en comparación con la pérdida de 10-12% en la temperatura más alta durante la mitad del tiempo.

ES 2 639 833 T3

Tabla 4: Contenido de monómero por SEC tras el almacenamiento a 25°C (t2) o 40°C (t1).

| | pH | [C1 INH] | Tampón | t0 | t1 | t2 |
|----|-----|----------|-----------|--------------|--------------|--------------|
| 5 | 5,9 | 400 | fosfato | 68,32 ± 1,04 | gel | 62,56 ± 0,94 |
| | | 500 | | 67,19 ± 0,14 | gel | 61,46 ± 0,14 |
| 10 | | 400 | histidina | 64,68 ± 0,42 | gel | 46,58 ± 1,09 |
| | | 500 | | 66,60 ± 0,08 | gel | 44,48 ± 1,04 |
| 15 | 6,9 | 400 | fosfato | 67,85 ± 0,22 | 55,29 ± 0,36 | |
| | | 500 | | 67,41 ± 0,36 | 54,79 ± 0,14 | 65,45 ± 0,23 |
| | | 400 | citrate | 67,82 ± 0,07 | 56,14 ± 0,41 | 65,49 ± 0,16 |
| | | 500 | | 67,43 ± 0,30 | 56,59 ± 0,33 | 65,03 ± 0,36 |
| 20 | 7,9 | 400 | fosfato | 67,85 ± 0,09 | 54,96 ± 0,52 | 61,31 ± 0,25 |
| | | 500 | | 67,58 ± 0,40 | 55,57 ± 0,56 | 64,98 ± 0,50 |
| 25 | | 400 | tris | 67,63 ± 0,27 | 55,40 ± 0,30 | 65,70 ± 0,56 |
| | | 500 | | 67,67 ± 0,47 | 56,18 ± 0,64 | 66,19 ± 0,84 |

Los datos indican que la tasa de degradación será de aproximadamente 13 veces a 35 veces más lento a 4°C que a 25°C. La estimación superior proviene del uso de un gráfico de Arrhenius. La estimación más baja proviene de la determinación de la pérdida media a medida que la temperatura se reduce en 5°C y extrapolando a una temperatura de almacenamiento de 4°C. Utilizando los datos actuales como un indicador, esto predice una pérdida de aproximadamente 3 a 10% después de dos años a temperaturas de refrigeración. En otras palabras, una formulación líquida parece ser bastante estable en base a estos datos. Además, las tasas de degradación son aproximadamente comparables entre las muestras de 400 U/ml y 500 U/ml, lo que sugiere que el desarrollo de la formulación de mayor concentración es igual de viable.

La velocidad de degradación es mucho más rápida a pH 5,9, lo que conduce a la gelificación a 40°C y mayores pérdidas a 25°C. Por lo tanto, el examen adicional de pH/tampón se centrará en el intervalo de pH 6,5 a 8,0. Hay un efecto de tampón claro en la viscosidad y posiblemente también sobre la estabilidad.

Los estudios demostraron que no hay un límite de solubilidad para la preparación de C1 INH en concentraciones de hasta 500 U/ml. Hay un aumento en la viscosidad una vez que las concentraciones alcanzan el intervalo de 400-500 U/ml (que es dependiente de tampón siendo el citrate mejor que el fosfato que es mejor que Tris), pero son manejables y todavía permiten la administración fácil por inyección para sistemas de jeringa estándar. En general, C1 INH es relativamente estable a la degradación química, como se determina por RP HPLC.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Gallagher, Cynthia
Ruddy, Steven
Manning, Mark

<120> C1-INH Composiciones y Métodos para la
Prevención y Tratamiento de Trastornos Asociados con Deficiencia de Inhibidor de Esterasa C1

<130> 1282-P05732WO00

<140> PCT/US2014/030309
<141> 2014-03-17

<150> 61/791.399
<151> 2013-03-15

<160> 1

ES 2 639 833 T3

<170> FastSEQ para Windows Versión 4,0

<210> 1

<211> 500

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

10      Met Ala Ser Arg Leu Thr Leu Leu Thr Leu Leu Leu Leu Leu Ala
        1          5          10          15
      Gly Asp Arg Ala Ser Ser Asn Pro Asn Ala Thr Ser Ser Ser Ser Gln
        20          25          30
    Asp Pro Glu Ser Leu Gln Asp Arg Gly Glu Gly Lys Val Ala Thr Thr
        35          40          45
    Val Ile Ser Lys Met Leu Phe Val Glu Pro Ile Leu Glu Val Ser Ser
    15      50          55          60
    Leu Pro Thr Thr Asn Ser Thr Thr Asn Ser Ala Thr Lys Ile Thr Ala
    65      70          75          80
    Asn Thr Thr Asp Glu Pro Thr Thr Gln Pro Thr Thr Glu Pro Thr Thr
        85          90          95
    Gln Pro Thr Ile Gln Pro Thr Gln Pro Thr Thr Gln Leu Pro Thr Asp
    20      100          105          110
    Ser Pro Thr Gln Pro Thr Thr Gly Ser Phe Cys Pro Gly Pro Val Thr
        115          120          125
    Leu Cys Ser Asp Leu Glu Ser His Ser Thr Glu Ala Val Leu Gly Asp
    25      130          135          140
    Ala Leu Val Asp Phe Ser Leu Lys Leu Tyr His Ala Phe Ser Ala Met
    145      150          155          160
    Lys Lys Val Glu Thr Asn Met Ala Phe Ser Pro Phe Ser Ile Ala Ser
        165          170          175
    Leu Leu Thr Gln Val Leu Leu Gly Ala Gly Glu Asn Thr Lys Thr Asn
        180          185          190
    Leu Glu Ser Ile Leu Ser Tyr Pro Lys Asp Phe Thr Cys Val His Gln
    30      195          200          205
    Ala Leu Lys Gly Phe Thr Thr Lys Gly Val Thr Ser Val Ser Gln Ile
        210          215          220
    Phe His Ser Pro Asp Leu Ala Ile Arg Asp Thr Phe Val Asn Ala Ser
    35      225          230          235          240
    Arg Thr Leu Tyr Ser Ser Ser Pro Arg Val Leu Ser Asn Asn Ser Asp
        245          250          255
    Ala Asn Leu Glu Leu Ile Asn Thr Trp Val Ala Lys Asn Thr Asn Asn

40      260          265          270
    Lys Ile Ser Arg Leu Leu Asp Ser Leu Pro Ser Asp Thr Arg Leu Val
        275          280          285
    Leu Leu Asn Ala Ile Tyr Leu Ser Ala Lys Trp Lys Thr Thr Phe Asp
        290          295          300
    Pro Lys Lys Thr Arg Met Glu Pro Phe His Phe Lys Asn Ser Val Ile
    45      305          310          315          320
    Lys Val Pro Met Met Asn Ser Lys Lys Tyr Pro Val Ala His Phe Ile
        325          330          335
    Asp Gln Thr Leu Lys Ala Lys Val Gly Gln Leu Gln Leu Ser His Asn
        340          345          350
    Leu Ser Leu Val Ile Leu Val Pro Gln Asn Leu Lys His Arg Leu Glu
    50      355          360          365
    Asp Met Glu Gln Ala Leu Ser Pro Ser Val Phe Lys Ala Ile Met Glu
        370          375          380
    Lys Leu Glu Met Ser Lys Phe Gln Pro Thr Leu Leu Thr Leu Pro Arg
    55      385          390          395          400
    Ile Lys Val Thr Thr Ser Gln Asp Met Leu Ser Ile Met Glu Lys Leu
        405          410          415
    Glu Phe Phe Asp Phe Ser Tyr Asp Leu Asn Leu Cys Gly Leu Thr Glu
        420          425          430
    Asp Pro Asp Leu Gln Val Ser Ala Met Gln His Gln Thr Val Leu Glu
        435          440          445
    Leu Thr Glu Thr Gly Val Glu Ala Ala Ala Ala Ser Ala Ile Ser Val
    60      450          455          460
    Ala Arg Thr Leu Leu Val Phe Glu Val Gln Gln Pro Phe Leu Phe Val
    465      470          475          480
    Leu Trp Asp Gln Gln His Lys Phe Pro Val Phe Met Gly Arg Val Tyr
        485          490          495
    Asp Pro Arg Ala
        500

```

Reivindicaciones

- 5 **1.** Una composición que comprende al menos un inhibidor de la esterasa C1, donde el al menos un inhibidor de la esterasa C1 está presente en 400 U/ml o más para su uso en el tratamiento, inhibición, o prevención del angioedema hereditario (AEH) y en el que dicha composición se administra por vía subcutánea.
- 2.** La composición para uso según la reivindicación 1, en el que el al menos un inhibidor de la esterasa C1 está presente en hasta 500 U/ml.
- 10 **3.** La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el al menos un inhibidor de la esterasa C1 se administra a una dosis que varía de 500 unidades a aproximadamente 5.000 unidades, 1.000 unidades a 3.500 unidades, o 1.500 unidades a 2.500 unidades.
- 15 **4.** La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el al menos un inhibidor de la esterasa C1 se administra diariamente, cada dos días, cada tres días, una vez a la semana, dos veces a la semana o tres veces a la semana.
- 5.** La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que se administra al sujeto una dosis inicial elevada de al menos un inhibidor de esterasa C1, seguida de dosis de mantenimiento más bajas, opcionalmente en donde la dosis inicial alta es al menos 1,5, 2, 3, 4, o 5 veces las dosis posteriores, y/o la dosis inicial alta se administra por vía intravenosa y el al menos un inhibidor de esterasa C1 se administra posteriormente subcutáneamente.
- 20 **6.** La composición para uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que la administración de al menos un inhibidor de esterasa C1 conduce a un aumento de los niveles del inhibidor de esterasa C1 en la sangre del sujeto, en donde los niveles en sangre del inhibidor de la esterasa C1 se incrementan a por lo menos 0,3 u/ml, 0,4 u/ml, o hasta 1 u/ml.
- 25 **7.** La composición para uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que los niveles en sangre del inhibidor de esterasa C1 se mantienen en o por encima de 0,4 U/ml durante por lo menos 50%, al menos 75%, al menos 90%, o al menos 95% del tiempo.
- 30 **8.** La composición para uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que:
- 35 (i) el angioedema hereditario es AEH de tipo I o tipo II,
(ii) la administración de al menos un inhibidor de esterasa C1 resulta en tratamiento profiláctico de AEH,
(iii) el tratamiento de AEH resulta en al menos una reducción en la gravedad y/o el número de ataques de AEH, o
40 (iv) la administración de al menos un inhibidor de esterasa C1 resulta en el tratamiento de un ataque de AEH.
- 9.** La composición para uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que al menos un inhibidor de esterasa C1 está aislado o purificado a partir de plasma humano o se produce por recombinación, y/o en el que el inhibidor de la esterasa C1 tiene una secuencia de aminoácidos de al menos 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos del inhibidor de esterasa C1 humana de la Figura 1.
- 45 **10.** La composición para uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la composición comprende un tampón que comprende citrato o citrato de sodio, opcionalmente 5 mM a 50 mM de citrato de sodio, 10 mM a 30 mM de citrato de sodio, o 20 mM de citrato de sodio.
- 50 **11.** La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende un tampón en el que el tampón no contiene citrato o ácido cítrico.
- 12.** La composición para uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la composición:
- 55 (i) comprende al menos un aminoácido o sal del mismo; y/o
(ii) tiene un pH de entre 6,5 y 8,0.
- 13.** La composición para uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la composición se forma a partir de una forma liofilizada por la reconstitución en un tampón antes de la administración.
- 60

```
1 MASRLTLLTL LLLLLAGDRA SSNPATSSS SQDPESLQDR GEGKVATTVI SKMLFVEPIL
61 EVSSLPTTNS TTNSATKITA NTTDEPTTQP TTEPTTQPTI QPTQPTTQLP TDSPTQPTTG
121 SFCPGPVTL C SDLESHSTEA VLGDALVDFS LKLYHAFSAM KKVETNMAFS PFSIASLLTQ
181 VLLGAGENTK TNLESILSYP KDFTCVHQAL KGFTTKGVTS VSQIFHSPDL AIRDTFVNAS
241 RTLYSSSPRV LSNNSDANLE LINTWVAKNT NNKISRLLDS LPSDTRLVLL NAIYLSAKWK
301 TTFDPKKTRM EPFHFKNSVI KVPMMNSKKY PVAHFIDQTL KAKVGQLQLS HNLSLVILVP
361 QNLKHRLEDM EQALSPSVFK AIMEKLEMSK FQPTLLTLPR IKVTTSQDML SIMEKLEFPD
421 PSYDLNLCGL TEDPDLQVSA MQHQTVLELT ETGVEAAAAS AISVARTLLV FEVQQPFLPV
481 LWDQQHKFPV FMGRVYDPRA
```

Figura 1

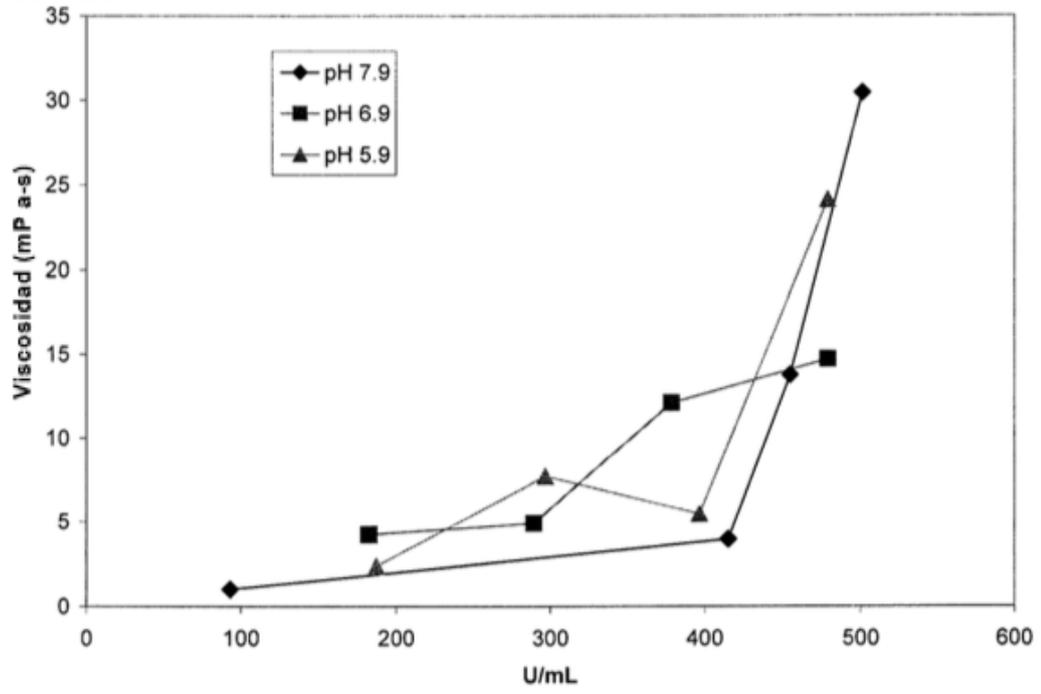


Figura 2