

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 440**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.07.2014 PCT/IB2014/062806**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15001504**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2014 E 14752412 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 3016677**

54 Título: **Formulaciones de anticuerpos y métodos**

30 Prioridad:

04.07.2013 US 201361843011 P
15.04.2014 US 201461979886 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.03.2019

73 Titular/es:

PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED (100.0%)
Adelphi Plaza, Upper George's Street, Dún
Laoghaire
Co. Dublin, A96 T927, IE

72 Inventor/es:

GARIDEL, PATRICK;
LANGER, ANDREAS y
GRUNDMAN, MICHAEL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 704 440 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 de anticuerpos y métodos

Referencia a un listado de secuencias

5 El Listado de Secuencias escrito en el archivo 446257SEQLIST.txt, creado el 1 de julio de 2014, para "Formulaciones y Métodos de Anticuerpos" es de 37,9 *kilobytes*.

Antecedentes

10 Las sinucleinopatías, también conocidas como enfermedades con cuerpos de Lewy (LBD), se caracterizan por una degeneración del sistema dopaminérgico, alteraciones motoras, deterioro cognitivo y formación de cuerpos de Lewy (LB) y/o neuritas de Lewy. (McKeith et al., *Neurology* (1996) 47: 1113-24.) Las sinucleinopatías incluyen la enfermedad de Parkinson (incluyendo la enfermedad de Parkinson idiopática), la Enfermedad con Cuerpos de Lewy Difusos (DLBD), también conocida como Demencia con Cuerpos de Lewy (DLB), la variante de la enfermedad de Alzheimer con cuerpos de Lewy (LBV), las enfermedades de Alzheimer y Parkinson Combinadas, el fallo autónomo puro y la atrofia sistémica múltiple (MSA; por ejemplo Atrofia Olivopontocerebelosa, Degeneración Estriatonigral y Síndrome de Shy-Drager). Varios signos y síntomas no motores son considerados como presagios de

15 sinucleinopatías en la fase prodrómica de las enfermedades (es decir, el período presintomático, subclínico, preclínico o premotor). Dichos signos tempranos incluyen, por ejemplo, trastorno de conducta asociado al sueño REM (RBD), pérdida del olfato y estreñimiento (Mahowald et al., *Neurology* (2010) 75: 488-489). Las enfermedades con cuerpos de Lewy siguen siendo una causa común de trastornos del movimiento y deterioro cognitivo en la población senescente (Galasko et al., *Arch. Neurol.* (1994) 51: 888-95).

20 La alfa-sinucleína forma parte de una gran familia de proteínas, incluyendo beta- y gamma-sinucleína y sinoretina. La alfa-sinucleína se expresa en el estado normal asociado con las sinapsis y se cree que desempeña un papel en la plasticidad neuronal, el aprendizaje y la memoria. Varios estudios han relacionado la alfa-sinucleína con un papel central en la patogénesis de la EP. La proteína se puede agregar formando fibrillas insolubles en condiciones patológicas. Por ejemplo, la sinucleína se acumula en LB (Spillantini et al., *Nature* (1997) 388: 839-40; Takeda et al., *J. Pathol.* (1998) 152: 367-72; Wakabayashi et al., *Neurosci. Lett.* (1997) 239: 45-8). Las mutaciones en el gen alfa-sinucleína se cosegregan con formas familiares raras de parkinsonismo (Kruger et al., *Nature Gen.* (1998) 18: 106-8; Polymeropoulos, et al., *Science* (1997) 276: 2045-7). La sobreexpresión de alfa sinucleína en ratones transgénicos (Masliah et al., *Science* (2000) 287: 1265-9) y *Drosophila* (Feany et al., *Nature* (2000) 404: 394-8) imita varios aspectos patológicos de la enfermedad con cuerpos de Lewy. Además se ha sugerido que los oligómeros solubles

25 de sinucleína pueden ser neurotóxicos (Conway KA, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) 97: 571-576; VollesMJ, Lansbury PT, Jr *Biochemistry* (2003) 42: 7871-7878). La acumulación de alfa-sinucleína con alteraciones morfológicas y neurológicas similares en especies y modelos animales tan diversos como los humanos, los ratones y las moscas sugiere que esta molécula contribuye al desarrollo de la enfermedad con cuerpos de Lewy.

30 En una serie de documentos se exponen formulaciones de proteínas y anticuerpos. Wang, *Int J Pharm.* 20 de agosto de 1999; 185(2): 129-88 presenta el comportamiento básico de proteínas, sus inestabilidades y su estabilización en estado acuoso en relación con el desarrollo de fármacos de proteína líquida. Wang et al. *J Pharm Sci.* enero de 2007; 96(1): 1-26 examinan la estructura y la función de anticuerpos y los mecanismos de inestabilidades físicas y químicas. Warne NW, *Eur J Pharm Biopharm.* junio de 2011; 78(2): 208-12, aborda el desarrollo de biofármacos de proteínas en alta concentración y el uso de estrategias de plataforma en el desarrollo de formulaciones. Un examen

35 de Daugherty & Mrsny, *Adv Drug Deliv Rev.* 7 de agosto de 2006; 58(5-6): 686-706, se centra en aspectos relacionados con la identificación y verificación de formulaciones estables a base de anticuerpos.

Compendio de la invención reivindicada

40 La presente invención proporciona formulaciones de anticuerpos tal como se definen en las reivindicaciones, útiles para la profilaxis y el tratamiento de la sinucleinopatía. La invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden (a) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 29 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 32, con o sin la lisina C-terminal, presente en una concentración de 36 mg/ml a 44 mg/ml; (b) tampón de citrato presente en una concentración de aproximadamente 20 mM; (c) trehalosa presente en una concentración de aproximadamente 230 mM; y (d) polisorbato 20 presente en una concentración de aproximadamente un 0,02% en

45 peso; estando caracterizada la formulación por un pH de aproximadamente 6.

En la formulación de la invención, el anticuerpo está presente en una concentración dentro del intervalo de 36 mg/ml a aproximadamente 44 mg/ml (por ejemplo, aproximadamente 40 mg/ml).

50 Preparadas tal como se describe en la presente memoria, algunas formulaciones representativas de la invención (a) se caracterizan por una osmolalidad de aproximadamente 335 mOsm/kg; (b) comprenden menos de aproximadamente un 10% del anticuerpo presente como un agregado en la formulación; (c) además comprenden un agente de carga; (d) son estériles; y/o (e) son estables al congelarse y descongelarse. Preparadas tal como se describe en la presente memoria, algunas formulaciones representativas de la invención (a) se caracterizan por una

osmolalidad de aproximadamente 295 mOsm/kg a aproximadamente 375 mOsm/kg; (b) comprenden menos de aproximadamente un 10% o menos de aproximadamente un 5% del anticuerpo presente como un agregado en la formulación; (c) además comprenden un agente de carga; (d) son estériles; y/o (e) son estables al congelarse y descongelarse.

- 5 El anticuerpo de las formulaciones descritas comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 29 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 32 con o sin la lisina C-terminal.

Las formulaciones de anticuerpos pueden estar liofilizadas. Las formulaciones liofilizadas pueden tener un pH entre aproximadamente 6 y aproximadamente 7 cuando están reconstituidas, tal como un pH 6,0 o 6,5 cuando están reconstituidas. Las formulaciones liofilizadas comprenden por regla general de aproximadamente 40 mg a aproximadamente 1.000 mg del anticuerpo. Las formulaciones liofilizadas comprenden por regla general polisorbato 20 en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente un 0,005% a aproximadamente un 0,05% en peso. Después de la reconstitución, las formulaciones liofilizadas producen una solución acuosa que comprende: (a) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 29 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una cualquiera de las SEQ ID N°: 31 o 32, con o sin la lisina C-terminal, que está presente en una concentración de aproximadamente 36 mg/ml a 44 mg/ml; (b) un tampón de citrato presente en una concentración de aproximadamente 20 mM; (c) trehalosa presente en una concentración de aproximadamente 230 mM; (d) polisorbato 20 presente en una concentración de aproximadamente un 0,2%; y (e) un pH de aproximadamente 6,0. Una formulación liofilizada representativa comprende aproximadamente 200 mg del anticuerpo.

También se describen ácidos nucleicos que codifican anticuerpos utilizados para preparar las formulaciones descritas. Por ejemplo, dichos ácidos nucleicos incluyen ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican una cadena ligera de anticuerpo de la SEQ ID N°: 29, y ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican una cadena pesada de anticuerpo de la SEQ ID N°: 32. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID N°: 17 codifica el componente de región variable de cadena ligera de 9E4 humanizado de la SEQ ID N°: 29. Como otro ejemplo, la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID N°: 20 codifica el componente de región variable de cadena pesada de 9E4 humanizado de la SEQ ID N°: 32.

Para la producción de anticuerpos, los ácidos nucleicos descritos se pueden incluir en un vector, individualmente o en combinación (por ejemplo, una combinación de un ácido nucleico que codifica una cadena ligera de 9E4 humanizado y un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de 9E4 humanizado). Por ejemplo, un vector puede comprender un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una cualquiera de las SEQ ID N°: 15-17; un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID N°: 18-20, o combinaciones de los mismos. Algunos vectores representativos de la descripción incluyen (a) un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de 9E4 humanizado mostrada como SEQ ID N°: 29 y una cadena pesada de 9E4 humanizado mostrada como SEQ ID N°: 31; y (b) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 29 y un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 32.

También se describen células huésped (por ejemplo células de CHO) que tienen incorporados de forma estable en sus genomas uno o más de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, una célula huésped puede comprender en su genoma un ácido nucleico integrado de forma estable que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una cualquiera de las SEQ ID N°: 15-17; un ácido nucleico integrado de forma estable que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID N°: 18-20, o combinaciones de los mismos. Algunas células huésped representativas de la descripción incluyen: (a) células huésped que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de 9E4 humanizado mostrada como SEQ ID N°: 29 y una cadena pesada de 9E4 humanizado mostrada como SEQ ID N°: 31; y (b) células huésped que comprenden un ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 29 y un ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 32.

La presente descripción también proporciona métodos para preparar formulaciones farmacéuticas. En un aspecto de la descripción, dicho método comprende: (a) cultivar células de mamífero que tienen incorporados de forma estable en su genoma ácidos nucleicos que codifican las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo 9E4 murino, quimérico, recubierto o humanizado de tal modo que las células segregan el anticuerpo en el medio de cultivo celular, y purificar el anticuerpo del medio de cultivo celular; y (b) preparar una formulación que comprende (i) una versión quimérica, recubierta o humanizada del anticuerpo 9E4 (Número de Acceso ATCC PTA-8221), o un fragmento de la misma que compete específicamente por la unión con 9E4, estando presente el anticuerpo en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml; (ii) tampón de citrato presente en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 30 mM; (iii) trehalosa presente en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 210 mM a aproximadamente 250 mM, y (iv) polisorbato 20 presente en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente un 0,005% a aproximadamente un 0,05% en peso; caracterizándose la formulación por un pH dentro del intervalo de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. Las células de mamífero útiles para este fin incluyen: (a) células huésped que tienen incorporadas de forma estable en sus genomas una secuencia de ácido nucleico que codifica

una cadena ligera de 9E4 humanizado mostrada como SEQ ID N°: 29 y una cadena pesada de 9E4 humanizado mostrada como SEQ ID N°: 31, y (b) células huésped que tienen incorporados de forma estable en sus genomas un ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 29 y un ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 32. En algunos aspectos de la descripción, los métodos descritos para preparar una formulación farmacéutica incluyen la etapa adicional de evaluar al menos una propiedad del anticuerpo en la formulación, tal como la estabilidad física, la estabilidad química y/o la actividad biológica.

Además se describen métodos para tratar terapéutica o profilácticamente a un paciente humano que padece o está en riesgo de padecer una sinucleinopatía, comprendiendo el método administrar al paciente una dosis eficaz de una formulación de la invención. Algunos pacientes susceptibles de tratamiento pueden padecer la enfermedad de Parkinson.

Los métodos de tratamiento terapéutico y profiláctico descritos incluyen terapias combinadas (es decir, administración de las formulaciones de anticuerpos descritas con una o más principios activos adicionales) para de este modo obtener resultados sinérgicos. Los dos o más principios activos se administran simultánea o consecutivamente, en cualquier orden. Por ejemplo, una formulación de la invención se puede administrar antes de la administración de un segundo principio activo, simultáneamente con un segundo principio activo, o después de la administración de un segundo principio activo. Una formulación de la invención se puede administrar simultánea o consecutivamente en combinación con, por ejemplo, levodopa, benzaserida, carbidopa, agonistas de la dopamina, inhibidores de la COMT, inhibidores de la MAO, amantadina o agentes anticolinérgicos.

De acuerdo con los métodos de tratamiento terapéutico y profiláctico descritos, las formulaciones de la invención se pueden administrar en múltiples dosis, por ejemplo, con una frecuencia dentro de un intervalo de aproximadamente una vez al día a aproximadamente una vez al año, tal como con una frecuencia dentro de un intervalo de aproximadamente una vez cada dos semanas a aproximadamente una vez cada tres meses, o tal como una vez al mes o cada cuatro semanas. En un aspecto, una formulación de anticuerpo de la invención se administra por vía intravenosa en una dosis dentro de intervalo de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg de principio activo. Algunos regímenes ejemplares incluyen aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 1,0 mg/kg, aproximadamente 3,0 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg de principio activo de 9E4 humanizado, administrado por vía intravenosa como una dosis única o una vez cada cuatro semanas.

Por ejemplo, un método descrito para tratar terapéutica o profilácticamente a un paciente humano que padece o está en riesgo de padecer una sinucleinopatía, como la enfermedad de Parkinson, puede comprender administrar al paciente una dosis eficaz de una formulación farmacéutica que comprende: (a) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 29 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 32, con o sin la lisina C-terminal, y que está presente en una concentración de aproximadamente 40 mg/ml; (b) un tampón de citrato presente en una concentración de aproximadamente 20 mM; (c) trehalosa presente en una concentración de aproximadamente 230 mM; (d) polisorbato 20 presente en una concentración de aproximadamente 0,2 g/l; y (e) un pH de aproximadamente 6,0. En dicho método, la dosis es por regla general de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg del anticuerpo (por ejemplo, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 8 mg/kg, o de aproximadamente 8 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg), administrados por vía intravenosa o subcutánea, con una frecuencia de aproximadamente una vez por semana a aproximadamente una vez cada 28 días, o aproximadamente cada tres meses.

La presente invención proporciona además un producto farmacéutico que comprende: (a) un vial que comprende (i) aproximadamente 200 mg de anticuerpo en forma de polvo, (ii) aproximadamente 25 mg de citrato de sodio deshidratado, (iii) aproximadamente 3,15 mg de ácido cítrico monohidrato; (iv) aproximadamente 435 mg de trehalosa deshidratada; y (v) aproximadamente 1 mg de polisorbato 20; (b) instrucciones para la reconstitución del anticuerpo; y (c) instrucciones para preparar el anticuerpo reconstituido para infusión, en donde (i) el anticuerpo comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 29 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 32 con o sin la lisina C-terminal; y (ii) las instrucciones de reconstitución requieren reconstitución con agua para inyección hasta un volumen extraíble de aproximadamente 5 ml.

Breve descripción de los dibujos

La FIGURA 1 es un termograma de DSC correspondiente al anticuerpo 9E4 humanizado, que muestra el flujo de energía (calorías/°C) asociado con el aumento o la disminución de la temperatura de una solución que contiene 1,5 mg/ml de anticuerpo 9E4 humanizado (versión H3L3). La solución de anticuerpo se calentó y se enfrió de forma secuencial, en el orden que se muestra en el recuadro. Las líneas están numeradas para indicar qué línea está asociada con cada una de las cinco transiciones de temperatura que se muestran en el recuadro.

La FIGURA 2 es un gráfico que representa las temperaturas de transición correspondientes al anticuerpo 9E4 humanizado (versión H3L3) en función del pH. Los diferentes símbolos muestran la temperatura de transición determinada por RALS, IF y DSC. Se observaron dos o tres temperaturas de transición de DSC

con cada pH, y cada una de ellas se presenta con un símbolo distinto.

La FIGURA 3 es un gráfico de barras que representa recuentos de partículas microscópicas ($\geq 2,0 \mu\text{m}$, $\geq 10,0 \mu\text{m}$ y $\geq 25,0 \mu\text{m}$) correspondientes a las formulaciones F1-F4 (tal como se describen en la Tabla 10) después de liofilización y reconstitución, sin período de almacenamiento.

5 La FIGURA 4 es un gráfico de barras que representa recuentos de partículas microscópicas ($\geq 2,0 \mu\text{m}$, $\geq 10,0 \mu\text{m}$ y $\geq 25,0 \mu\text{m}$) correspondientes a las formulaciones F1-F4 (tal como se describen en la Tabla 10) después de liofilización, almacenamiento a 40 °C durante un mes y reconstitución.

10 La FIGURA 5 es un gráfico de barras que representa recuentos de partículas microscópicas ($\geq 2,0 \mu\text{m}$, $\geq 10,0 \mu\text{m}$ y $\geq 25,0 \mu\text{m}$) correspondientes a las formulaciones F1-F4 (tal como se describen en la Tabla 10) después de liofilización, almacenamiento a 40 °C durante dos meses y reconstitución.

La FIGURA 6 es un gráfico de barras que representa recuentos de partículas microscópicas ($\geq 2,0 \mu\text{m}$, $\geq 10,0 \mu\text{m}$ y $\geq 25,0 \mu\text{m}$) correspondientes a las formulaciones F1-F4 (tal como se describen en la Tabla 10) después de liofilización, almacenamiento a 40 °C durante tres meses y reconstitución.

15 La FIGURA 7 es un gráfico que representa la pérdida del anticuerpo 9E4 humanizado monomérico (versión H3L3) en función de la formulación (F1-F4, tal como se describen en la Tabla 10) y el tiempo de almacenamiento en forma liofilizada a 40 °C.

Breve descripción de las secuencias

La SEQ ID N°: 1 es la secuencia de aminoácidos de la región variable m9E4VL.

20 La SEQ ID N°: 2 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la secuencia aceptora de VL humana (código de acceso NCBI AAY33350).

La SEQ ID N°: 3 es la secuencia de aminoácidos de la región variable Hu9E4VLv1.

La SEQ ID N°: 4 es la secuencia de aminoácidos de la región variable Hu9E4VLv2.

La SEQ ID N°: 5 es la secuencia de aminoácidos de la región variable Hu9E4VLv3.

La SEQ ID N°: 6 es la secuencia de aminoácidos de la región variable m9E4VH.

25 La SEQ ID N°: 7 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la secuencia aceptora de VH humana (código de acceso NCBI AAC50998).

La SEQ ID N°: 8 es la secuencia de aminoácidos de la región variable Hu9E4VHv1.

La SEQ ID N°: 9 es la secuencia de aminoácidos de la región variable Hu9E4VHv2.

La SEQ ID N°: 10 es la secuencia de aminoácidos de la región variable Hu9E4VHv3.

30 La SEQ ID N°: 11 es la secuencia de aminoácidos de la región variable Hu9E4VHv4.

La SEQ ID N°: 12 es la secuencia de aminoácidos de la alfa-sinucleína humana de tipo silvestre.

La SEQ ID N°: 13 es la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena ligera de 9E4 humanizado, con arginina en el extremo N.

35 La SEQ ID N°: 14 es la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada de 9E4 humanizado.

La SEQ ID N°: 15 es la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable Hu9E4VLv1.

La SEQ ID N°: 16 es la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable Hu9E4VLv2.

La SEQ ID N°: 17 es la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable Hu9E4VLv3.

La SEQ ID N°: 18 es la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de Hu9E4VHv1.

40 La SEQ ID N°: 19 es la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable Hu9E4VHv2.

La SEQ ID N°: 20 es la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable Hu9E4VHv3.

La SEQ ID N°: 21 es la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable Hu9E4VHv4.

La SEQ ID N°: 22 es la secuencia de aminoácidos del péptido señal Hu9E4VL.

La SEQ ID N°: 23 es la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal Hu9E4VL.

La SEQ ID N°: 24 es la secuencia de aminoácidos del péptido señal Hu9E4VH.

La SEQ ID N°: 25 es la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal Hu9E4VH.

La SEQ ID N°: 26 es la secuencia de aminoácidos consenso de Hu9E4VL.

5 La SEQ ID N°: 27 es la secuencia de aminoácidos consenso de Hu9E4VH.

La SEQ ID N°: 28 es la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena ligera de 9E4 humanizado, sin la arginina en el extremo N.

La SEQ ID N°: 29 es la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 9E4 humanizado que comprende (a) una región variable (versión 3), y (b) una región constante con arginina en el extremo N.

10 La SEQ ID N°: 30 es la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 9E4 humanizado que comprende (a) una región variable (versión 3), y (b) una región constante sin la arginina en el extremo N.

La SEQ ID N°: 31 es la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 9E4 humanizado que comprende (a) una región variable (versión 3), y (b) una región constante.

15 La SEQ ID N°: 32 es la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 9E4 humanizado que comprende (a) una región variable (versión 3), y (b) una región constante de alotipo G1m3 de cadena pesada de la versión BIP.

La SEQ ID N°: 33 es la secuencia de aminoácidos de la región constante de alotipo G1m3 de cadena pesada de la versión BIP.

Definiciones

20 El término "anticuerpo" incluye anticuerpos intactos y fragmentos de unión de los mismos. Por regla general, los fragmentos compiten con el anticuerpo intacto del que han sido derivados para la unión específica con la diana. Los fragmentos incluyen cadenas pesadas independientes, cadenas ligeras independientes, Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂c, Fv, anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos de dominio único. El término "anticuerpo" también incluye un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos
25 pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes (véase, por ejemplo, Songvilai y Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79: 315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol., 148: 1547-53 (1992)).

La unidad estructural básica del anticuerpo consiste en un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero incluye dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una
30 cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La parte amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. Cuando se expresa inicialmente, esta región variable suele estar ligada a un péptido señal escindible. A veces, la región variable sin el péptido señal se designa como región variable madura. Así, por ejemplo, una región variable madura de cadena ligera significa una región variable de cadena ligera sin el péptido señal de cadena ligera. La parte carboxi-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la
35 función efectora. Una región constante puede incluir cualquiera de una región CH1, una región bisagra, una región CH2 y una región CH3, o todas ellas.

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones variable y constante están unidas por una región "J" de aproximadamente 12
40 o más aminoácidos, y la cadena pesada también incluye una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos. (Véase, *en general*, Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, NY, 1989), cap. 7.)

Las regiones variables maduras de cada par de cadenas ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en el caso de los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son el mismo. Todas las cadenas presentan la misma estructura general de
45 regiones armazón (FR) relativamente conservadas, unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas por las regiones armazón, permitiendo la unión con un epítipo específico. Del extremo N al extremo C, tanto las cadenas ligeras como las pesadas comprenden las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada región es conforme a las definiciones de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991), o Chothia & Lesk, J. Mol. Biol.
50 196: 901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342: 878-883 (1989). Kabat también proporciona una convención de numeración muy utilizada (numeración de Kabat) en la que a los residuos correspondientes entre diferentes cadenas pesadas o entre diferentes cadenas ligeras se les asigna el mismo número.

5 El porcentaje de identidades de secuencia se determina con secuencias de anticuerpos alineadas al máximo mediante la convención de numeración de Kabat. Después de la alineación, si una región de anticuerpo de un individuo (por ejemplo, la región variable madura completa de una cadena pesada o ligera) se compara con la misma región de un anticuerpo de referencia, el porcentaje de identidad de secuencia entre las regiones de anticuerpo del individuo y de referencia es el número de posiciones ocupadas por el mismo aminoácido tanto en la región del anticuerpo del individuo como en la región del anticuerpo de referencia, dividido por el número total de posiciones alineadas de las dos regiones (sin contar los espacios vacíos) y multiplicado por 100 para convertirlo en porcentaje.

10 Con el fin de clasificar las sustituciones de aminoácidos como conservativas o no conservativas, los aminoácidos se agrupan de la siguiente manera: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile; Grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutras): Cys, Ser, Thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): Asp, Glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): Asn, Gln, His, Lys, Arg; Grupo V (residuos que influyen en la orientación de la cadena): Gly, Pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): Trp, Tyr, Phe. Las sustituciones conservativas implican sustituciones entre aminoácidos de la misma clase.

15 Las sustituciones no conservativas constituyen el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

20 Por regla general, los anticuerpos de la invención se unen a su diana designada con una constante de afinidad de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 o 10^{10} M⁻¹. Dicha unión es una unión específica en el sentido de que es perceptiblemente mayor en magnitud y distinguible de la unión no específica que se produce con al menos una diana no relacionada. La unión específica puede ser el resultado de la formación de enlaces entre grupos funcionales particulares o de un ajuste espacial particular (por ejemplo, de tipo cerradura y llave), mientras que la unión no específica suele ser el resultado de las fuerzas de van der Waals. Sin embargo, la unión específica no implica necesariamente que un anticuerpo monoclonal se una a una y solo una diana.

25 El término "síntoma" se refiere a la constancia subjetiva de una enfermedad, tal como la marcha alterada, percibida por un individuo. Un "signo" se refiere a la constancia objetiva de una enfermedad, observada por un médico.

Un individuo tiene mayor riesgo de contraer una enfermedad si tiene al menos un factor de riesgo conocido (por ejemplo, antecedentes genéticos, bioquímicos, familiares, exposición circunstancial), que hace que los individuos con dicho factor de riesgo presenten un mayor riesgo estadísticamente significativo de desarrollar la enfermedad que los individuos sin el factor de riesgo. El concepto "significación estadística" quiere decir $p \leq 0,05$.

30 A menos que el contexto indique evidentemente otra cosa, el término "aproximadamente" abarca valores dentro de la desviación estándar de la media de un valor establecido o +/- 5% de un valor establecido, el que sea mayor.

El término "anticuerpo 9E4" se refiere a cualquier anticuerpo en el que cada una de las CDR es sustancialmente la de 9E4, y por lo tanto incluye 9E4 murino, quimérico, recubierto y humanizado.

35 A menos que el contexto indique evidentemente otra cosa, la referencia a un intervalo incluye cualquier número entero dentro del intervalo.

Descripción detallada

I. General

40 El 9E4 es un anticuerpo que se une a un epítipo dentro de los residuos de aminoácido 118-126 de la alfa-sinucleína humana. Las formas humanizadas del anticuerpo se describen en el documento WO/2013/063516, que se incorpora como referencia en su totalidad a todos los efectos. La presente descripción proporciona formulaciones líquidas y liofilizadas que incorporan formas quiméricas, recubiertas o humanizadas de 9E4 (a veces designadas como anticuerpos 9E4). Las formulaciones se diseñan para que tengan combinaciones de componentes que confieren estabilidad al anticuerpo tal como se describe más abajo.

II. Moléculas diana

45 La alfa-sinucleína de tipo silvestre humana natural es un péptido de 140 aminoácidos que contiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAEAA GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH
 GVATVAEKTK EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKQQL
 GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA (SEQ ID N°: 12)

50 (Ueda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90: 11282-6); número de acceso de GenBank: P37840. La proteína tiene tres dominios reconocidos: un dominio de repetición KTK que cubre los aminoácidos 1-61; un dominio NAC (componente no amiloide) que se extiende desde aproximadamente los aminoácidos 60-95; y un dominio ácido C-

terminal que se extiende desde aproximadamente el aminoácido 98 hasta el 140.

A menos que el contexto indique evidentemente otra cosa, la referencia a la alfa-sinucleína o sus fragmentos incluye las secuencias de aminoácidos de tipo silvestre humana naturales indicadas más arriba, y sus variantes alélicas humanas, en particular aquellas asociadas con la enfermedad con cuerpos de Lewy (por ejemplo, variantes E46K, A30P y A53T, indicando la primera letra el aminoácido en la SEQ ID N°: 12, indicando el número la posición del codón en la SEQ ID N°: 12, e indicando la segunda letra el aminoácido en la variante alélica). Dichas variantes pueden estar presentes opcionalmente de forma individual o en cualquier combinación en cualquiera de los aspectos de la invención descritos más abajo. Las mutaciones inducidas E83Q, A90V, A76T, que mejoran la agregación de sinucleína alfa, también pueden estar presentes de forma individual o en combinación entre sí y/o con variantes alélicas humanas E46K, A30P y A53T.

III. Enfermedades con cuerpos de Lewy

Las Enfermedades con Cuerpos de Lewy (LBD) se caracterizan por una degeneración del sistema dopaminérgico, alteraciones motoras, deterioro cognitivo y formación de cuerpos de Lewy (LB). (McKeith et al., *Neurology* (1996) 47: 1113-24.) Los cuerpos de Lewy son depósitos de proteínas esféricas que se encuentran en las neuronas. Su presencia en el cerebro altera la función normal del cerebro interrumpiendo la acción de los mensajeros químicos, incluida la acetilcolina y la dopamina. Las enfermedades con cuerpos de Lewy incluyen la enfermedad de Parkinson (incluida la enfermedad de Parkinson idiopática), la Enfermedad con Cuerpos de Lewy Difusos (DLBD), también conocida como Demencia con Cuerpos de Lewy (DLB), la variante de la enfermedad de Alzheimer con cuerpos de Lewy (LBV), las enfermedades de Alzheimer y Parkinson Combinadas, y la atrofia sistémica múltiple (MSA; por ejemplo Atrofia Olivopontocerebelosa, Degeneración Estriatonigral y Síndrome de Shy-Drager). La DLBD comparte los síntomas de la enfermedad de Alzheimer y de la enfermedad Parkinson. La DLBD se diferencia de la enfermedad de Parkinson principalmente en la ubicación de los cuerpos de Lewy. En la DLBD, los cuerpos de Lewy se forman principalmente en la corteza. En la enfermedad de Parkinson, se forman principalmente en la sustancia negra. Otras enfermedades con cuerpos de Lewy incluyen el Fallo Autónomo Puro, la disfagia con cuerpos de Lewy, la LBD incidental y la LBD hereditaria (por ejemplo mutaciones del gen de alfa-sinucleína, PARK3 y PARK4).

IV. Anticuerpos 9E4 humanizados

A. Especificidad de unión y propiedades funcionales

Los anticuerpos humanizados de la invención se unen específicamente a la alfa sinucleína humana. La afinidad de algunos anticuerpos humanizados descritos (es decir, Ka) está preferiblemente dentro de un factor de cinco o dos con respecto a la del anticuerpo 9E4 de ratón. Algunos anticuerpos humanizados tienen una afinidad que es igual (dentro del error experimental) o mayor que la del anticuerpo 9E4 de ratón. Los anticuerpos humanizados preferentes se unen al mismo epítipo y/o compiten con el anticuerpo 9E4 de ratón por la unión con la sinucleína alfa humana.

En algunos anticuerpos, el 9E4 humanizado forma un brazo de un anticuerpo biespecífico, cuyo otro brazo es un anticuerpo que se une a un receptor expresado en la barrera hematoencefálica, como un receptor de insulina, un receptor de factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), un receptor de leptina o un receptor de lipoproteína, o preferiblemente un receptor de transferrina (Friden et al., *PNAS* 88: 4771-4775, 1991; Friden et al., *Science* 259: 373-377, 1993). Dicho anticuerpo biespecífico puede ser transferido a través de la barrera hematoencefálica por medio de la transcitosis mediada por receptores. La absorción cerebral del anticuerpo biespecífico se puede mejorar adicionalmente mediante ingeniería del anticuerpo biespecífico para reducir su afinidad por el receptor de la barrera hematoencefálica. La afinidad reducida por el receptor ha dado lugar a una distribución más amplia en el cerebro (véase, por ejemplo, Atwal. et al. *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra43, 2011; Yu et al. *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra44, 2011).

Los anticuerpos biespecíficos ejemplares también pueden ser (1) un anticuerpo de dominio variable dual (DVD-Ig), en el que cada cadena ligera y cadena pesada contiene dos dominios variables en tándem a través de un enlace peptídico corto (Wu et al., *Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-IgTM) Molecule*, en: *Antibody Engineering*, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) un Tandab, que consiste en una fusión de dos diacuerpos de cadena sencilla que dan como resultado un anticuerpo biespecífico tetravalente que tiene dos sitios de unión para cada uno de los antígenos diana; (3) un flexicuerpo, que es una combinación de scFv con un diacuerpo que resulta en una molécula multivalente; (4) una, así llamada, molécula de "acoplamiento y bloqueo", basada en el "dominio de dimerización y acoplamiento" en la Proteína Quinasa A, que, cuando se aplica a Fabs, puede producir una proteína de unión biespecífica trivalente que consiste en dos fragmentos Fab idénticos unidos a un fragmento Fab diferente; (5) una, así llamada, molécula Escorpión, que comprende, por ejemplo, dos scFv fusionados en ambos extremos de una región Fc humana. Los ejemplos de plataformas útiles para preparar anticuerpos biespecíficos incluyen, pero no se limitan a BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab y Mab2 (F-star), IgG1 de ingeniería Fc (Xencor) o DuoBody (basado en el intercambio del brazo Fab, Genmab).

B. Anticuerpos humanizados

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo modificado por ingeniería genética en el que las CDR de un anticuerpo "donador" no humano se injertan en secuencias de anticuerpos "aceptores" humanos (véase, por ejemplo, Queen et

al., US 5,530,101 y 5,585,089; Winter et al., US 5,225,539, Carter, US 6,407,213, Adair, US 5,859,205 6,881,557, Foote, US 6,881,557). Las secuencias de anticuerpos aceptores pueden ser, por ejemplo, una secuencia de región variable de anticuerpo humano maduro, un compuesto de secuencias de este tipo, una secuencia de consenso de secuencias de anticuerpo humano (por ejemplo, secuencias de consenso de región variable de cadena ligera y pesada de Kabat, 1991, supra), o una secuencia de región variable de la línea germinal. Una secuencia aceptora preferente para la cadena pesada es la región variable de cadena pesada madura humana con código de acceso NCBI AAC50998 (GI: 1791009) u otra región variable de cadena pesada derivada de la línea germinal IGHV3-7*01 o IGHV3-7*02 (nombre de clon V3-7 o VH3-11) (Glas et al., Clin Exp Immunol. 107: 372-80, 1997), o una secuencia de región variable de cadena pesada madura que incorpora una de estas secuencias de línea germinal. Para la cadena ligera, una secuencia aceptora preferente es la región variable madura de cadena ligera con código de acceso NCBI AAY33350 (GI: 63102889) u otra secuencia de cadena ligera madura derivada de la línea germinal IGKV1D-39 o IGKV1-39 (nombre de clon O2 u O12) (Kramer et al., Eur J Immunol. 35: 2131-45, 2005), o una secuencia de región variable madura de cadena ligera que incorpora una de estas secuencias de línea germinal. Por lo tanto, un anticuerpo humanizado de la invención incluye anticuerpos que tienen tres CDR de cadena ligera y tres de cadena pesada, según la definición de Kabat, procedentes del anticuerpo 9E4 múrido (anticuerpo donador) y las secuencias armazón de la región variable madura y las regiones constantes, si están presentes, total o sustancialmente procedentes de secuencias de anticuerpo humano. Del mismo modo, una cadena pesada humanizada incluye cadenas pesadas que tienen tres CDR de cadena pesada, según la definición de Kabat, procedentes de la cadena pesada del anticuerpo 9E4 múrido, y una secuencia variable de cadena pesada madura y una secuencia de región constante de cadena pesada, si está presente, total o sustancialmente procedentes de secuencias de cadena pesada de anticuerpo humano. Del mismo modo, una cadena ligera humanizada incluye cadenas ligeras que tienen tres CDR de cadena ligera, según la definición de Kabat, procedentes de la cadena ligera del anticuerpo 9E4 múrido, y una secuencia variable de cadena ligera madura y una secuencia de región constante de cadena ligera, si está presente, total o sustancialmente procedentes de secuencias de cadena ligera de anticuerpo humano. Las secuencias armazón de región variable madura de una cadena de anticuerpo o la secuencia de región constante de una cadena de anticuerpo proceden sustancialmente de una secuencia armazón de región variable madura humana o secuencia de región constante humana, respectivamente, cuando al menos el 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de los residuos correspondientes definidos por Kabat son idénticos.

Determinados aminoácidos de los residuos de la región armazón variable madura humana se pueden seleccionar para la sustitución en función de su posible influencia en la conformación de CDR y/o la unión con antígeno. La investigación de estas posibles influencias se realiza mediante modelado, examen de las características de los aminoácidos en ubicaciones particulares, u observación empírica de los efectos de la sustitución o mutagénesis de aminoácidos particulares.

Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un residuo de armazón de región variable madura múrida y un residuo de armazón de región variable madura humana seleccionado, el aminoácido de armazón humano puede ser sustituido por el aminoácido de armazón equivalente del anticuerpo de ratón cuando se espera razonablemente que el aminoácido:

- (1) se una directamente con el antígeno de forma no covalente,
- (2) sea adyacente a una región CDR,
- (3) de lo contrario, interactúe con una región CDR (por ejemplo, que esté dentro de aproximadamente 6 Å de una región CDR),
- (4) medie en la interacción entre las cadenas pesadas y ligeras.

La descripción proporciona formulaciones que incluyen formas humanizadas del anticuerpo 9E4 de ratón que incluyen tres regiones variables maduras de cadena ligera humanizadas ejemplificadas (Hu9E4VLv1-v3; SEQ ID N°: 3-5) y cuatro regiones variables maduras de cadena pesada humanizadas ejemplificadas (Hu9E4VHv1-v4; SEQ ID N°: 8-11). La SEQ ID N°: 4 incluye las tres CDR de Kabat de cadena ligera de 9E4 de ratón y los armazones de región variable madura de AAY33350. SEQ ID N°: 3 y 5 incluyen retromutaciones tal como se muestra en la Tabla 2. La SEQ ID N°: 11 incluye las tres CDR de Kabat de 9E4 de ratón y los armazones de región variable madura de AAC50998. Las SEQ ID N°: 8-10 incluyen retromutaciones tal como se muestra en la Tabla 3.

La descripción proporciona formulaciones que incluyen variantes de un anticuerpo 9E4 humanizado descrito en la presente memoria, en el que la región variable madura de cadena pesada humanizada muestra al menos el 90%, 95% o 99% de identidad con las SEQ ID N°: 8-11 y la región variable madura de cadena ligera humanizada muestra al menos un 90, 95 o 99% de identidad de secuencia con las SEQ ID N°: 3-5, pero en el que cualquier variación de la SEQ ID N°: designada se produce en un armazón de región variable madura en lugar de una CDR de Kabat. En algunos de estos anticuerpos, la posición L36 está ocupada por Y o F, y/o la posición L83 está ocupada por F o L, y/o la posición H73 está ocupada por N o D y/o la posición H93 está ocupada por A o S (aquí, como en otros lugares de esta solicitud, todas las posiciones corresponden a la numeración de Kabat). En algunos de estos anticuerpos se retienen algunas o todas las retromutaciones en Hu9E4VLv1-v3 y Hu9E4VHv1-v4. En otras palabras, una o las dos posiciones de cadena pesada H73 y H93 están ocupadas por D y A, respectivamente. Del mismo modo, en algunos

| Anticuerpo ejemplar | L36 | L83 | H73 | H93 |
|---------------------|-----|-----|-----|-----|
| 7 (versión 1) | F | F | D | S |
| 8 | F | L | D | S |
| 9 | Y | L | N | A |
| 10 | Y | L | D | A |
| 11 | Y | L | N | S |
| 12 | Y | L | D | S |
| 13 | Y | F | D | A |
| 14 | Y | F | D | S |
| 15 (versión 2) | Y | F | N | S |

Tabla 2: Retromutaciones V_H

| Variante V _H | Secuencia aceptora de exón V _H | Residuos de armazón donador |
|-------------------------|---|-----------------------------|
| Hu9E4VHv1 | Código de acceso NCBI AAC50998 | H73, H93 |
| Hu9E4VHv2 | Código de acceso NCBI AAC50998 | H93 |
| Hu9E4VHv3 | Código de acceso NCBI AAC50998 | H73 |

Tabla 3: Retromutaciones V_L

| Variante V _L | Secuencia aceptora de exón V _L | Residuos de armazón donador |
|-------------------------|---|-----------------------------|
| Hu9E4VLv1 | Código de acceso NCBI AAY33350 | L36 |
| Hu9E4VLv2 | Código de acceso NCBI AAY33350 | Ninguno |
| Hu9E4VLv3 | Código de acceso NCBI AAY33350 | L36, L83 |

5 En algunos anticuerpos, la región variable madura de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID N°: 10. En algunos anticuerpos, la región variable madura de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID N°: 5 o SEQ ID N°: 3. En algunos de estos anticuerpos, la región variable madura de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID N°: 10, y la

10 región variable madura de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID N°: 5 o SEQ ID N°: 3. En algunos de estos anticuerpos, la región variable madura de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID N°: 10, y la región variable madura de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID N°: 5.

15 En el armazón de la región variable madura se pueden hacer otras sustituciones de aminoácidos, por ejemplo en residuos que no están en contacto con las CDR. A menudo, las sustituciones realizadas en variantes de secuencias humanizadas son conservativas con respecto a los aminoácidos sustituidos. En algunos anticuerpos, las sustituciones relativas a Hu9E4VLv1-v3 y Hu9E4VHv1-v4 (sean o no conservativas) no tienen ningún efecto sustancial en la afinidad o potencia de unión del anticuerpo resultante en relación con Hu9E4VLv1-v3 y Hu9E4VHv1-v4, es decir, su capacidad para unirse a sinucleína alfa humana.

20 Por regla general, las variantes difieren de las secuencias de región variable madura de las cadenas pesadas y ligeras de Hu9E4VLv1-v3 y Hu9E4VHv1-v4 en un número pequeño de sustituciones, deleciones o inserciones (por ejemplo, normalmente no más de 1, 2, 3, 5 o 10 en el armazón de región variable madura de cadena ligera o de cadena pesada, o en ambos).

25 Las formulaciones abajo descritas pueden incluir cualquiera de las cadenas de 9E4 humanizado descritas más arriba, o en el listado de secuencias o en cualquier otro lugar de la solicitud, en cualquier combinación de cadenas ligeras y pesadas que forme un anticuerpo 9E4 humanizado que se una específicamente a la alfa-sinucleína humana.

C. Anticuerpos quiméricos y recubiertos

La descripción proporciona además formas quiméricas y recubiertas de anticuerpos no humanos, en particular 9E4.

Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el que las regiones variables maduras de cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo no humano (por ejemplo, de un ratón) están combinadas con regiones constantes de cadena ligera y pesada de un anticuerpo de una especie diferente. Por regla general, las regiones constantes de cadena ligera y pesada son de origen humano, pero las regiones constantes pueden proceder de una especie no humana diferente, tal como una rata, según sea necesario (por ejemplo, para facilitar el análisis del anticuerpo no humano en un modelo animal apropiado). Dichos anticuerpos conservan sustancial o totalmente la especificidad de unión del anticuerpo no humano (por ejemplo, de ratón) que proporciona las regiones variables, y son aproximadamente dos tercios de la secuencia humana (o de diferentes especies no humanas).

Un anticuerpo recubierto es un tipo de anticuerpo humanizado que conserva algunas de las CDR, y generalmente todas ellas, y algunos de los residuos de armazón de región variable no humana de un anticuerpo no humano, pero que sustituye otros residuos de armazón de región variable que pueden contribuir a epítomos de células B o T, por ejemplo residuos expuestos (Padlan, Mol. Immunol. 28: 489, 1991) con residuos de las posiciones correspondientes de una secuencia de anticuerpo humano. El resultado es un anticuerpo en el que las CDR son total o sustancialmente de un anticuerpo no humano y los armazones de región variable del anticuerpo no humano son más parecidos a los humanos debido a las sustituciones. Las formas recubiertas de 9E4 están incluidas en la descripción.

D. Selección de una región constante

Las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos quiméricos, recubiertos o humanizados se pueden unir a al menos una parte de una región constante humana. La elección de la región constante depende, en parte, de si se desea citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos y/o citotoxicidad dependiente de complemento. Por ejemplo, los isótopos humanos IgG1 e IgG3 tienen citotoxicidad dependiente de complemento y los isotipos humanos IgG2 e IgG4 no la tienen. La IgG1 y la IgG3 humanas también inducen funciones efectoras mediadas por células más fuertes que la IgG2 y la IgG4 humanas. Las regiones constantes de cadena ligera pueden ser lambda o kappa. Una región constante kappa de cadena ligera humana ejemplar tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13. Algunas de dichas regiones constantes kappa de cadena ligera pueden ser codificadas por una secuencia de ácido nucleico. La arginina N-terminal de la SEQ ID N°: 13 se puede omitir, en cuyo caso la región constante kappa de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 28. Algunas de dichas regiones constantes kappa de cadena ligera pueden ser codificadas por una secuencia de ácido nucleico. Una región constante de cadena pesada de IgG1 humana ejemplar tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14 (con o sin la lisina C-terminal) o el componente de región constante de cadena pesada de la SEQ ID N°: 31. Algunas de dichas regiones constantes de cadena pesada pueden ser codificadas por una secuencia de ácido nucleico. Los anticuerpos pueden ser expresados como tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos pesadas, como cadenas pesadas, cadenas ligeras independientes, como Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, o como anticuerpos de cadena sencilla en los que dominios variables maduros de cadena pesada y ligera están unidos a través de un espaciador.

Las regiones constantes humanas muestran variación alotípica y variación isoalotípica entre diferentes individuos, es decir, las regiones constantes pueden diferir en diferentes individuos en una o más posiciones polimórficas. Los isoalotipos se diferencian de los alotipos en que los sueros que reconocen un isoalotipo se unen a una región no polimórfica de otro u otros isotipos. Así, por ejemplo, otra región constante de cadena pesada es del alotipo IgG1 Gln3 y tiene la secuencia de aminoácidos que codifica una región constante de la SEQ ID N°: 32. Otra región constante de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 33. Otra región constante de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos que codifica una región de contenido de la SEQ ID N°: 32, excepto que carece de la lisina C-terminal. Otra región constante de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 33, excepto que carece de la lisina C-terminal.

Uno o varios aminoácidos en el extremo amino o carboxi de la cadena ligera y/o pesada, como la lisina C-terminal de la cadena pesada, pueden faltar o derivarse en una proporción de las moléculas o en la totalidad de las mismas. Es posible realizar sustituciones en las regiones constantes para reducir o aumentar la función efectora, como la citotoxicidad mediada por complemento o ADCC (véase, por ejemplo, Winter et al., Patente de EE. UU. n° 5,624,821; Tso et al., Patente de EE. UU. n° 5,834,597; y Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 4005, 2006), o para prolongar la vida media en humanos (véase, por ejemplo, Hinton et al., J. Biol. Chem. 279: 6213, 2004). Las sustituciones ejemplares incluyen una Gln en la posición 250 y/o una Leu en la posición 428 (en este párrafo se usa la numeración EU para la región constante) para aumentar la vida media de un anticuerpo. La sustitución en cualquiera de las posiciones 234, 235, 236 y/o 237 o en todas ellas reduce la afinidad por receptores Fcγ, en particular por el receptor FcγRI (véase, por ejemplo, el documento US 6,624,821). Algunos anticuerpos tienen sustitución de alanina en las posiciones 234, 235 y 237 de la IgG1 humana para reducir las funciones efectoras. Opcionalmente, las posiciones 234, 236 y/o 237 en la IgG2 humana están sustituidas con alanina y la posición 235 con glutamina (véase, por ejemplo, el documento US 5,624,821).

E. Expresión de anticuerpos recombinantes

Los anticuerpos se pueden producir por expresión recombinante. Los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos se pueden someter a optimización de codones para la expresión en el tipo de célula deseado (por ejemplo, CHO o Sp2/0). Por regla general, las construcciones de ácidos nucleicos recombinantes incluyen una secuencia de control de expresión unida operativamente con las secuencias codificadoras de las cadenas de anticuerpo, incluyendo regiones promotoras asociadas de forma natural o heterólogas. Las secuencias de control de expresión pueden ser sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucariotas. Una vez que el vector se ha incorporado al huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y la recolección y purificación de los anticuerpos de reacción cruzada. El vector o los vectores que codifican las cadenas de anticuerpo también pueden contener un gen seleccionable, tal como dihidrofolato reductasa, para permitir la amplificación del número de copias de los ácidos nucleicos que codifican las cadenas de anticuerpo.

La *E. coli* es un huésped procarionta particularmente útil para expresar anticuerpos, en particular fragmentos de anticuerpo. Los microbios, como la levadura, también son útiles para la expresión. El *Saccharomyces* es un huésped de levadura preferente, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de expresión, un origen de replicación, secuencias de terminación y similares, según se desee. Los promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glucolíticas. Los promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, promotores de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C y enzimas responsables de utilidades de maltosa y galactosa.

Las células de mamífero pueden ser utilizadas para expresar segmentos de nucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas. Véase Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Editores, NY, 1987). En la técnica se han desarrollado varias líneas celulares huésped adecuadas capaces de segregar proteínas heterólogas intactas, e incluyen líneas celulares CHO, varias líneas celulares COS, células HeLa, células HEK293, células L y mielomas que no producen anticuerpos, incluyendo Sp2/0 y NS0. Puede resultar ventajoso utilizar células no humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de expresión, tal como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión de ribosoma, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras de transcripción. Las secuencias de control de expresión adecuadas son promotores derivados de genes endógenos, citomegalovirus, SV40, adenovirus, papilomavirus bovino y similares. Véase Co et al., *J. Immunol.* 148: 1149 (1992).

Una vez introducidos el o los vectores codificadores de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo en el cultivo celular, los conjuntos de células se pueden escrutar para determinar la productividad de crecimiento y la calidad del producto en medios libres de suero. Los conjuntos de células de mayor productividad pueden ser sometidos después a clonación de células individuales basada en FACS para generar líneas monoclonales. Pueden ser ventajosas productividades específicas por encima de 50 pg o 100 pg por célula por día, que corresponden a títulos de productos de más de 7,5 g/l de cultivo. Los anticuerpos producidos por clones de células individuales también se pueden ensayar para determinar la turbidez, las propiedades de filtración, PAGE, IEF, exploración por UV, HP-SEC, cartografía de oligosacáridos de hidrato de carbono, espectrometría de masas y ensayos de unión, como ELISA o Biacore. Un clon seleccionado se puede guardar después en múltiples viales y almacenar congelado para su uso posterior.

Una vez expresados, los anticuerpos se pueden purificar de acuerdo con los procedimientos estándar de la técnica, incluyendo captura de proteína A, cromatografía en columna (por ejemplo, interacción hidrófoba o intercambio iónico), pH bajo para inactivación viral y similares (véase, en general, Scopes, *Protein Purification* (editorial Springer, NY, 1982)).

Metodología para la producción comercial de anticuerpos, incluyendo optimización de codones, selección de promotores, elementos de transcripción y terminadores, clonación de células individuales sin suero, bancos de células, uso de marcadores de selección para la amplificación del número de copias, terminador de CHO, clonación de células individuales sin suero, mejora de los títulos de proteínas (véanse, por ejemplo, los documentos US 5,786,464, US 6,114,148, US 6,063,598, US 7,569,339, WO2004/050884, WO2008/012142, WO2008/012142, WO2005/019442, WO2008/107388, y WO2009/027471, y US 5,888,809).

V. Ácidos nucleicos

La descripción proporciona además ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las cadenas pesadas y ligeras arriba descritas. Por regla general, los ácidos nucleicos también codifican un péptido señal fusionado con las cadenas pesadas y ligeras maduras (por ejemplo, péptidos señal que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID N°: 22 y 24 que pueden ser codificados por SEQ ID N°: 23 y 25). Las secuencias de codificación en ácidos nucleicos pueden estar en un enlace operable con secuencias reguladoras para asegurar la expresión de las secuencias de codificación, tales como un promotor, un potenciador, un sitio de unión de ribosoma, una señal de terminación de transcripción y similares. Los ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas y ligeras se pueden encontrar en forma aislada o se pueden clonar en uno o más vectores. Los ácidos nucleicos se pueden sintetizar, por ejemplo, mediante síntesis en estado sólido o PCR de oligonucleótidos superpuestos. Los ácidos nucleicos que codifican

cadena pesada y ligera se pueden unir como un ácido nucleico contiguo, por ejemplo dentro de un vector de expresión, o pueden ser independientes, por ejemplo, cada uno clonado en su propio vector de expresión.

VI. Aplicaciones terapéuticas

5 La descripción proporciona varios métodos para tratar o realizar la profilaxis de la enfermedad con cuerpos de Lewy en pacientes que padecen o que están en riesgo de padecer dicha enfermedad. Los pacientes susceptibles de tratamiento incluyen individuos con riesgo de enfermedad de una LBD pero que no presentan síntomas, así como
10 pacientes que actualmente presentan síntomas o los signos de advertencia temprana de sinucleinopatías, por ejemplo desaceleración del EEG, manifestaciones neuropsiquiátricas (depresión, demencia, alucinaciones, ansiedad, apatía, anhedonia), cambios autónomos (hipotensión ortostática, trastornos de la vejiga, estreñimiento, incontinencia fecal, sialorrea, disfagia, disfunción sexual, cambios en el flujo sanguíneo cerebral), cambios
15 sensoriales (olfato, dolor, sensaciones anómalas de discriminación de color), trastornos del sueño (trastorno de conducta asociado al sueño REM (RBD), síndrome de piernas inquietas/movimientos periódicos de las extremidades, hipersomnia, insomnio) y otros signos y síntomas diversos (fatiga, diplopía, visión borrosa, seborrea, pérdida/aumento de peso). Por lo tanto, los presentes métodos pueden ser administrados profilácticamente a individuos que tienen un riesgo genético conocido de una LBD. Estos individuos incluyen aquellos que tienen
20 parientes que han sufrido esta enfermedad y aquellos cuyo riesgo está determinado por análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo hacia la EP incluyen mutaciones en los genes alfa-sinucleína o Parkin, UCHL1 y CYP2D6; en particular mutaciones en las posiciones 30 y 53 del gen de alfa-sinucleína. Las personas que actualmente padecen la enfermedad de Parkinson pueden ser reconocidas por sus manifestaciones clínicas, que incluyen temblor en reposo, rigidez muscular, bradicinesia e inestabilidad postural.

En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20, 30). No obstante, por regla general no es necesario comenzar el tratamiento hasta que un paciente llega a los 40, 50, 60 o 70. El tratamiento generalmente implica múltiples dosis durante un período de tiempo. El tratamiento se puede controlar
25 ensayando el anticuerpo, o las respuestas de células T o células B activadas a un agente terapéutico (por ejemplo, una forma truncada de péptido alfa-sinucleína) a lo largo del tiempo. Si la respuesta decae, se indica una dosis de refuerzo.

Los anticuerpos pueden ser utilizados para tratar o realizar la profilaxis de la enfermedad con cuerpos de Lewy en pacientes mediante administración en condiciones que generan una respuesta terapéutica beneficiosa en un
30 paciente (por ejemplo, reducción de agregados de alfa sinucleína neurítica y/o axonal, reducción de la distrofia neurítica, mejora de la función cognitiva, y/o reversión, tratamiento o prevención del deterioro cognitivo) en el paciente. En algunos métodos, las áreas de distrofia neurítica en el neuropilo de neocórtex y/o los ganglios basales se pueden reducir de promedio al menos un 10%, 20%, 30% o 40% en pacientes tratados en comparación con una población de control.

En pacientes que padecen o tienen riesgo de padecer la enfermedad con cuerpos de Lewy se observan
35 comúnmente deterioro cognitivo, disminución progresiva de la función cognitiva, cambios en la morfología cerebral y cambios en la función cerebrovascular. La administración de los presentes anticuerpos puede inhibir o retrasar el deterioro de la función cognitiva en dichos pacientes.

La invención también proporciona métodos para conservar o aumentar la densidad sináptica y/o la densidad
40 dendrítica. Mediante marcadores de formación de sinapsis (sinaptofisina) y/o dendritas (MAP2) se puede medir un índice de cambios en la densidad sináptica o dendrítica. En algunos métodos, la densidad sináptica o dendrítica se puede restaurar al nivel de la densidad sináptica o dendrítica en un individuo sano. En algunos métodos, el nivel medio de densidad sináptica o dendrítica en pacientes tratados se puede aumentar en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% o más en comparación con una población de pacientes de control no tratados.

VII. Tratamiento

45 En aplicaciones profilácticas, a un paciente susceptible, o de otro modo en riesgo, de padecer una enfermedad se le administra un anticuerpo o agente para inducir un anticuerpo o una formulación que incluye el mismo en un régimen (dosis, frecuencia y vía de administración) eficaz para reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar la aparición de al menos un signo o síntoma de la enfermedad. En algunas aplicaciones profilácticas, el régimen es eficaz para
50 inhibir o retrasar la acumulación de sinucleína alfa y fragmentos truncados en el cerebro, y/o inhibir o retrasar sus efectos tóxicos y/o inhibir o retrasar el desarrollo de déficits de comportamiento. En aplicaciones terapéuticas, a un paciente del que se sospecha que sufre una enfermedad con cuerpos de Lewy, o que ya la sufre, se le administra un anticuerpo o agente para inducir un anticuerpo en un régimen (dosis, frecuencia y vía de administración) eficaz para mejorar o al menos inhibir el deterioro adicional de al menos un signo o síntoma de la enfermedad. En algunas aplicaciones terapéuticas, el régimen es eficaz para reducir o al menos inhibir el aumento adicional de los niveles de
55 sinucleína alfa y fragmentos truncados, las toxicidades asociadas y/o los déficits de comportamiento.

Un régimen se considera terapéutico o profilácticamente eficaz si un paciente tratado individualmente logra un resultado más favorable que el resultado medio de una población de control de pacientes comparables no tratados mediante los métodos de la invención, o si se demuestra un resultado más favorable en los pacientes tratados frente

a los pacientes de control en un ensayo clínico controlado (por ejemplo, un ensayo de fase II, fase II/III o fase III) a un nivel de $p < 0,05$ o $0,01$ o incluso $0,001$.

Las dosis efectivas varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluidos los medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, incluyendo el tipo de enfermedad con cuerpos de Lewy, si el paciente es portador de ApoE, si el paciente es humano o animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico.

Un intervalo de dosificación ejemplar para anticuerpos es de aproximadamente 0,1 a 50 mg/kg de peso corporal del paciente. El anticuerpo se puede administrar en dichas dosis a diario, en días alternos, semanalmente, quincenalmente, mensualmente, trimestralmente, anualmente o de acuerdo con cualquier otro calendario determinado mediante análisis empírico. Un tratamiento ejemplar implica la administración en múltiples dosis durante un período prolongado, por ejemplo de al menos seis meses. Los regímenes de tratamiento ejemplares adicionales implican la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses.

Los anticuerpos se pueden administrar a través de una vía periférica (es decir, una en la que un anticuerpo administrado cruza la barrera hematoencefálica para alcanzar un sitio previsto en el cerebro). Las vías de administración incluyen las vías tópica, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, intranasal o intramuscular. Algunas vías para la administración de anticuerpos son las vías intravenosa y subcutánea. Este tipo de inyección se realiza generalmente en los músculos del brazo o de la pierna. En algunos métodos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular en el que se han acumulado depósitos, por ejemplo inyección intracraneal.

Los presentes regímenes se pueden administrar en combinación con otro agente eficaz en el tratamiento o la profilaxis de la enfermedad que se está tratando. Por ejemplo, en el caso de la enfermedad de Parkinson se pueden utilizar inmunoterapia contra la alfa sinucleína WO/2008/103472, levodopa, benzaserida, carbidopa, agonistas de dopamina, agonistas de dopamina diferentes al comezuelo del centeno, inhibidores de catecol-O-metilo ("COMT") tales como, por ejemplo, entacopona o tolcapona, inhibidores de la monoamino oxidasa ("MAO"), tales como, por ejemplo, rasagalina, amantadina o agentes anticolinérgicos, en combinación con los presentes regímenes.

Una dosis eficaz de cualquiera de las formulaciones farmacéuticas descritas con mayor detalle más abajo se puede administrar para tratar terapéutica o profilácticamente a un paciente humano que padece o está en riesgo de padecer una sinucleinopatía. Algunas de las formulaciones descritas más abajo se pueden añadir a una bolsa de infusión adecuada para la administración intravenosa a un paciente, por ejemplo, para la administración cada cuatro semanas. A algunos pacientes se les ha diagnosticado la enfermedad de Parkinson. Las formulaciones descritas en la presente memoria se pueden administrar en una dosis de aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg o aproximadamente 30 mg/kg de principio activo de 9E4 humanizado. En algunos pacientes, la dosis se puede ajustar adicionalmente de acuerdo con la tolerancia, la seguridad, la farmacocinética, la eficacia y otros parámetros que se pueden determinar empíricamente.

VIII. Formulaciones

Las formulaciones de la invención se presentan en las reivindicaciones.

Las formulaciones (también conocidas como composiciones farmacéuticas) de la descripción comprenden un anticuerpo (por ejemplo, una versión quimérica, recubierta o humanizada de 9E4 múrido (Número de Acceso ATCC PTA-8221)) o un fragmento de unión de antígeno del mismo, un tampón, uno o más azúcares y/o polioles y un agente tensioactivo, y tienen un pH dentro del intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 7,5. Las formulaciones se pueden preparar para el almacenamiento en forma líquida o en forma liofilizada. Cuando se almacenan en forma liofilizada, las formulaciones se pueden reconstituir con un líquido (por ejemplo, agua estéril) para obtener las concentraciones y propiedades descritas en la presente memoria. Cuando se dice que una composición liofilizada se puede reconstituir añadiendo agua para generar una formulación con concentraciones de componentes y pH específicos, se entiende que la formulación liofilizada se puede reconstituir simplemente mediante la adición de agua (es decir, sin suministrar cantidades adicionales de componentes ni añadir ácido o base para cambiar el pH). Las concentraciones y propiedades de una formulación líquida preliofilizada también pueden ser correspondientes a las que se describen más abajo si la formulación liofilizada se reconstituye al mismo volumen que la preliofilización de la formulación. Si el volumen es diferente, las concentraciones de formulaciones se deben ajustar proporcionalmente. Por ejemplo, si el volumen reconstituido es la mitad del volumen de preliofilización, las concentraciones de los componentes en la formulación de preliofilización deberían corresponder a la mitad de las concentraciones en la formulación reconstituida.

Opcionalmente, el anticuerpo 9E4 purificado a partir de un cultivo de células de CHO se resuspende en una formulación tal como se describe más abajo, se congela temporalmente para la preliofilización de almacenamiento, se liofiliza y se reconstituye con agua hasta las mismas concentraciones que la preliofilización. Preferiblemente, dicha formulación debería estabilizar el anticuerpo a lo largo de toda la congelación, liofilización, almacenamiento y reconstitución, además de ser adecuada para la administración parenteral. En un flujo de trabajo ejemplar, el anticuerpo purificado se resuspende a aproximadamente 40 mg/ml en la Formulación 3 (Tabla 10) y se almacena

congelado a -40 °C en bolsas. Las bolsas se descongelan a temperatura ambiente durante 3 horas y los contenidos se agrupan. La formulación se filtra de forma estéril a través de un filtro estéril de 0,2 micras. Unos viales se llenan con 5,4 ml de la formulación y se liofilizan. Los viales liofilizados se almacenan a 2-8 °C. Los viales liofilizados se reconstituyen añadiendo agua estéril (por ejemplo, aproximadamente de 5,0 a 5,4 ml de agua estéril, dependiendo de la formulación). Después se añaden 5 ml del producto reconstituido a través del catéter de una bolsa IV que contiene 20-100 ml de solución salina normal, solución de Ringer con lactato o solución de dextrosa al 5% o similar para infusión intravenosa en un paciente.

Algunas formulaciones incluyen un agente de carga, que puede o no ser el mismo que el componente de azúcar/polioil. Por regla general, las formulaciones son estériles, por ejemplo, tal como se logra mediante filtración estéril usando un filtro de 0,2 µm o un filtro de 0,22 µm. Algunas formulaciones tienen una carga biológica de ≤ aproximadamente 3 UFC/30 ml. Algunas formulaciones contienen ≤ aproximadamente 0,1 EU/mg de endotoxinas bacterianas. Las formulaciones de la invención también son generalmente estables con niveles de fragmentación y/o agregación de bajos a indetectables tal como se define adicionalmente más abajo en la congelación y descongelación. Otras formulaciones son estables después de la reconstitución de una torta liofilizada durante al menos tres meses a 40 grados Celsius. En algunas formulaciones, menos de aproximadamente un 10% del anticuerpo está presente como un agregado en la formulación. En algunas formulaciones, una cantidad menor o igual que aproximadamente un 5% del anticuerpo está presente como un agregado en la formulación.

En algunas formulaciones, el anticuerpo está presente en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml. En algunas formulaciones, el anticuerpo está presente en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml. En algunas formulaciones, el anticuerpo está presente en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar presente en una concentración de aproximadamente 35-45 mg/ml o de aproximadamente 40 mg/ml. El anticuerpo puede estar presente en una forma de dosificación líquida estéril de aproximadamente 50 mg/vial a aproximadamente 500 mg/vial, o más. El anticuerpo puede estar presente en una forma de dosificación liofilizada de aproximadamente 40 mg/vial a aproximadamente 500 mg/vial. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar presente en una forma de dosificación líquida o liofilizada estéril de aproximadamente 250-350 mg/vial o de aproximadamente 200 mg/vial.

Los anticuerpos utilizados en las formulaciones descritas se pueden acoplar con un resto terapéutico, tal como un agente citotóxico, un agente radioterapéutico, un inmunomodulador, un segundo anticuerpo (por ejemplo, para formar un heteroconjugado de anticuerpos), o cualquier otro agente biológicamente activo que facilite o mejore la actividad del anticuerpo formulado (por ejemplo, 9E4 quimérico, recubierto o humanizado). Los restos terapéuticos representativos incluyen agentes que se sabe que son útiles para el tratamiento, la gestión o la mejora de una enfermedad con cuerpos de Lewy o de síntomas de una sinucleinopatía.

El anticuerpo formulado puede comprender cualquiera de las versiones quiméricas, recubiertas o humanizadas del anticuerpo 9E4 arriba descritas. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender una región variable de cadena ligera que comprende las tres CDR de Kabat de la SEQ ID N°: 4 y una región variable de cadena pesada que comprende las tres CDR de Kabat de la SEQ ID N°: 11. La formulación puede incluir un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4 o SEQ ID N°: 5, y/o una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, o SEQ ID N°: 11. Algunas formulaciones incluyen un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 5. Algunas formulaciones incluyen un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 10. Por ejemplo, el anticuerpo formulado puede comprender una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 5 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 10.

En las formulaciones descritas se utilizan tampones para lograr un pH adecuado para el anticuerpo, tal como, por ejemplo, tampones de histidina, succinato y citrato. Algunas formulaciones tienen un pH dentro del intervalo de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7, por ejemplo, un pH de 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 o 7,0. Algunas formulaciones tienen un pH entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5. Algunas formulaciones tienen un pH de aproximadamente 6,0 y otras formulaciones tienen un pH de aproximadamente 6,5. En algunas formulaciones, el tampón de citrato o el tampón de succinato está presente en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM, por ejemplo, en una concentración de aproximadamente 15-25 mM o aproximadamente 20 mM. Algunos tampones de citrato comprenden citrato de sodio deshidratado y ácido cítrico monohidratado en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 20 mM y de un intervalo de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 6 mM, respectivamente.

Los azúcares y/o polioles adecuados para las formulaciones incluyen trehalosa, sacarosa, manitol, o una combinación de los mismos. Los azúcares/polioles sirven como agentes de carga, agentes de lioprotección y/o agentes de ajuste de la tonicidad. Por ejemplo, algunas formulaciones incluyen trehalosa presente en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 220 mM a aproximadamente 260 mM, sacarosa presente en

una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 220 mM a aproximadamente 260 mM, o una mezcla de sacarosa presente en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM y manitol presente en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 220 mM. Algunas formulaciones incluyen trehalosa presente en una concentración de aproximadamente 230 mM o 240 mM. Otras formulaciones incluyen sacarosa presente en una concentración de aproximadamente 230 mM o 240 mM. Otras formulaciones incluyen una mezcla de sacarosa presente en una concentración de aproximadamente 50 mM y manitol presente en una concentración de aproximadamente 200 mM. Otra formulación incluye una mezcla de sacarosa presente en una concentración de aproximadamente 28 mM y manitol presente en una concentración de aproximadamente 212 mM. Algunas de estas formulaciones se caracterizan por una osmolalidad dentro del intervalo de aproximadamente 250-400, 300-400 o 300-350 mOsm/kg, como por ejemplo 335 mOsm/kg.

Las formulaciones contienen preferiblemente un agente tensioactivo para reducir la agregación de anticuerpos y la absorción en las superficies. Los agentes tensioactivos adecuados incluyen polisorbato 20 (PS20) presente en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente un 0,005% a aproximadamente un 0,05% en peso. El PS20 protege contra los fuertes aumentos en la agregación o turbidez que en otro caso se producirían en las formulaciones de anticuerpos 9E4. El polisorbato 20 puede estar presente en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente un 0,01% a aproximadamente un 0,05%. Por ejemplo, la concentración puede ser de un 0,005%, 0,01%, 0,015%, 0,02%, 0,025%, 0,03%, 0,035%, 0,04%, 0,045% o 0,05%. Alternativamente, en algunas formulaciones, el polisorbato 20 está presente en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 0,05 g/l, 0,1 g/l, 0,15 g/l, 0,2 g/l, 0,25 g/l, 0,3 g/l, 0,35 g/l, 0,4 g/l, 0,45 g/l, o 0,5 g/l. Algunas formulaciones incluyen polisorbato 20 en una concentración de 0,2 g/l (es decir, 0,163 mmol/l).

Una formulación ejemplar (líquida, preliofilizada o reconstituida después de la liofilización) se caracteriza por un pH dentro del intervalo de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7 e incluye: (a) una versión quimérica, recubierta o humanizada del anticuerpo 9E4, o un fragmento del mismo que compite con el 9E4 específicamente por la unión con el antígeno en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml; (b) un tampón de citrato o tampón de succinato presente en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM; (c) uno o más azúcares y polioles ("azúcar/poliole") seleccionados entre trehalosa presente en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 220 mM a aproximadamente 260 mM, sacarosa presente en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 220 mM a aproximadamente 260 mM, y una mezcla de sacarosa presente en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM y manitol presente en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 220 mM; y (d) polisorbato 20 presente en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente un 0,005% a aproximadamente un 0,05% en peso. Por ejemplo, la formulación puede incluir: (a) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID N°: 29 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID N°: 32, con o sin la lisina C-terminal, y que está presente en una concentración de aproximadamente 40 mg/ml; (b) un tampón de citrato en una concentración de aproximadamente 20 mM; (c) trehalosa en una concentración de aproximadamente 230 mM; (d) polisorbato 20 en una concentración de aproximadamente un 0,02%; y un pH de aproximadamente 6,0.

Algunas formulaciones liofilizadas incluyen: (a) una versión humanizada del anticuerpo 9E4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; (b) citrato; (c) trehalosa; y polisorbato 20. La formulación liofilizada puede incluir aproximadamente 200 mg del anticuerpo. Algunas formulaciones liofilizadas se pueden reconstituir con agua estéril. Algunas formulaciones liofilizadas incluyen 100-300 o 150-250 mg de anticuerpo 9E4, 15-35 o 20-25 mg de citrato de sodio deshidratado, 1,65-2,75 o 2-2,3 mg de ácido cítrico monohidrato, 360-500 o 400-470 mg de trehalosa deshidratada, y de 0,5 a 1,5 mg o de 0,75 a 1,25 mg de polisorbato 20. Una formulación liofilizada ejemplar incluye 200 mg de un anticuerpo 9E4 (por ejemplo, anticuerpo 9E4 humanizado), 25 mg de citrato de sodio deshidratado, 2,15 mg de ácido cítrico monohidrato, 435 mg de trehalosa deshidratada, y 1 mg de polisorbato 20. Otra formulación liofilizada ejemplar incluye 200 mg de un anticuerpo 9E4 (por ejemplo, anticuerpo 9E4 humanizado), 25 mg de citrato de sodio deshidratado, 3,15 mg de ácido cítrico monohidrato, 435 mg de trehalosa deshidratada y 1 mg de polisorbato 20. Estas formulaciones se reconstituyen preferiblemente en un volumen de aproximadamente 5 ml. Otras formulaciones liofilizadas incluyen los mismos componentes en las mismas proporciones que las descritas en este párrafo, pero en cantidades diferentes (por ejemplo, 400 mg de anticuerpo, 50 mg de citrato de sodio, 4,3 mg de ácido cítrico monohidrato, 870 mg de trehalosa deshidratada y 2 mg de polisorbato 20).

Las formulaciones liofilizadas se reconstituyen preferiblemente a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 30-50 o 35-45 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 40 mg/ml; (b) un tampón de citrato presente en una concentración de aproximadamente 10-30 o 15-25 mM, preferiblemente de aproximadamente 20 mM; (c) trehalosa presente en una concentración de aproximadamente 160-330 o 200-260 mM, preferiblemente de aproximadamente 230 mM; (d) polisorbato 20 presente en una concentración de aproximadamente 0,1-0,3 o de 0,15 a 0,25 g/l, preferiblemente de aproximadamente 0,2 g/l; y (e) un pH de aproximadamente 5,5-6,5, preferiblemente de aproximadamente 6,0.

Preferiblemente, las formulaciones líquidas o liofilizadas reconstituidas son sustancialmente isotónicas, lo que implica una osmolalidad de aproximadamente 250-350 mOsm/kg de agua. Algunas formulaciones tienen una osmolalidad de aproximadamente 335 mOsm/kg. Algunas formulaciones tienen una osmolalidad de 270-300

mOsm/kg. Las formulaciones líquidas o liofilizadas reconstituidas también pueden ser hipertónicas (> 350 mOsm/kg de agua) o hipotónicas (< 250 mOsm/kg de agua).

Algunas formulaciones liofilizadas se presentan como un polvo de color blanco a amarillento. Algunas formulaciones líquidas o liofilizadas reconstituidas se presentan como una solución prácticamente libre de partículas extrañas y pueden contener algunas partículas típicas de productos translúcidos, de color blanco a blanquecino. Algunas formulaciones líquidas o liofilizadas reconstituidas tienen \leq aproximadamente 6.000 partículas microscópicas \geq 10 μm por vial (volumen = 5 ml) y/o \leq aproximadamente 600 partículas microscópicas \geq 25 μm por vial. Algunas formulaciones líquidas o liofilizadas reconstituidas se presentan con un aspecto de incoloro a ligeramente amarillo (\leq solución de referencia BY3). Algunas formulaciones líquidas o liofilizadas reconstituidas se presentan con un aspecto de claro a ligeramente opalescente (\leq suspensión de referencia III).

Cualquiera de las formulaciones descritas se puede preparar sin excipientes farmacéuticos, vehículos o similares, aparte de los descritos como componentes en la presente memoria. Una formulación de este tipo se puede describir como consistente en los componentes enumerados, o consistente esencialmente en los componentes enumerados en caso de presencia de cantidades insignificantes de otros componentes que no afecten a las propiedades de la formulación. Las formulaciones se preparan preferiblemente bajo prácticas correctas de fabricación (GMP) aprobadas o susceptibles de ser aprobadas por la FDA para la preparación de medicamentos para administración a humanos.

Los anticuerpos utilizados en las formulaciones descritas también se pueden acoplar con un marcador detectable, por ejemplo útil para diagnosticar una sinucleinopatía, para controlar el progreso de una sinucleinopatía y/o para evaluar la eficacia del tratamiento. Los anticuerpos formulados tal como se ha descrito son particularmente útiles para realizar dichas determinaciones en individuos que padecen o son susceptibles de padecer una sinucleinopatía tal como la enfermedad de Parkinson, o en muestras biológicas apropiadas obtenidas de estos individuos. Los marcadores detectables representativos que se pueden acoplar o unir a un anticuerpo 9E4 humanizado incluyen varias enzimas, tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos protésicos, tales como estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como umbeliferona, fluoresceína, isotiocinato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, como luminol; materiales bioluminiscentes, tales como luciferasa, luciferina y aequorina; materiales radiactivos, tales como, pero no limitados a yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), and tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenón (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn y ^{117}Tm ; metales emisores de positrones utilizando diversas tomografías de emisión de positrones, iones metálicos paramagnéticos no radiactivos y moléculas que están radiomarcadas o conjugadas con radioisótopos específicos.

Los restos terapéuticos y/o sustancias detectables se pueden acoplar o conjugar directamente con un anticuerpo 9E4 múrido, quimérico, recubierto o humanizado, o indirectamente a través de un intermediario (por ejemplo, un enlazador) utilizando técnicas conocidas. Véase, *por ejemplo*, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe et al., *Immunol. Rev.*, 1982, 62:119-58.

Los anticuerpos utilizados en las formulaciones descritas también incluyen formas modificadas de anticuerpos 9E4 múridos, quiméricos, revestidos o humanizados, que tienen vidas medias *in vivo* aumentadas en relación con los anticuerpos no modificados correspondientes. Dichas formas modificadas se pueden preparar, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación mediante grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína. Como ejemplo, en el documento WO 02/060919 se describen métodos representativos para la prolongación de la vida media de anticuerpos.

La presente invención abarca formulaciones de anticuerpos que tienen estabilidad a 38°C-42°C (por ejemplo, según evaluación mediante cromatografía de exclusión por tamaños de alto rendimiento (HPSEC)) durante al menos aproximadamente 30 días, formulaciones que tienen estabilidad a 20 °C-24 °C durante al menos aproximadamente 1 año, y formulaciones que tienen estabilidad entre 2 °C y 4 °C durante al menos aproximadamente 3 años. La estabilidad de las formulaciones liofilizadas se evalúa para su almacenamiento en el estado liofilizado. Una formulación se considera estable si, después de la incubación en una o más de estas combinaciones de tiempo y temperatura especificadas, cumple con la definición dada más abajo de fragmentación de baja a indetectable y/o de agregación de baja a indetectable. Más particularmente, las formulaciones descritas presentan niveles de agregación y/o fragmentación de anticuerpos de bajos a no detectables, o un aumento bajo o indetectable en la fragmentación y/o agregación de anticuerpos por encima de un nivel inicial (por ejemplo, menos de aproximadamente 10% de agregación). Algunas formulaciones presentan \leq aproximadamente un 5% de agregación

y/o fragmentación combinada. Una formulación que tiene niveles de fragmentación de bajos a indetectables contiene al menos aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la proteína total, por ejemplo en un solo pico según determinación mediante cromatografía de exclusión por tamaños de alto rendimiento (HPSEC), o en dos picos (uno correspondiente a cada una de las cadenas pesadas de anticuerpo y cadenas ligeras de anticuerpo) mediante Electroforesis en Gel Capilar reducida (rCGE), que representa el anticuerpo no degradado y que no contiene otros picos individuales que tengan más de un 5%, más de un 4%, más de un 3%, más de un 2%, más de un 1% o más de un 0,5% de la proteína total cada una. Una formulación que tiene niveles de agregación de bajos a indetectables no contiene más de aproximadamente un 15%, no más de aproximadamente un 10%, no más de aproximadamente un 5%, no más de aproximadamente un 4%, no más de aproximadamente un 3%, no más de aproximadamente un 2% %, no más de aproximadamente un 1% o no más de aproximadamente un 0,5% de agregación en peso de proteína, según medición a través de cromatografía de exclusión por tamaños de alto rendimiento (HPSEC). Por ejemplo, en algunas formulaciones, menos de aproximadamente un 10% del anticuerpo anti-sinucleína está presente en forma de un agregado. Las formulaciones estables de la invención también muestran poca o ninguna pérdida de actividad(es) biológica(s) de un 9E4 quimérico, recubierto o humanizado, que tiene, por ejemplo, afinidad de unión medible a través de ELISA y/o ensayo funcional adicional, que corresponde al menos a aproximadamente un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de un valor medible inicial. Algunas formulaciones tienen una afinidad de unión que es de aproximadamente un 60% a aproximadamente un 140% con respecto a un valor medible inicial del material de referencia.

IX. Preparación de formulaciones farmacéuticas

La presente descripción también proporciona métodos para preparar formulaciones farmacéuticas. En un aspecto de la descripción, dicho método comprende: (a) cultivar células de mamíferos que tienen incorporados de manera estable en su genoma ácidos nucleicos que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo murino 9E4 (Número de Acceso ATCC PTA-8221), o de versiones quiméricas, recubiertas o humanizadas de las mismas, de modo que las células segregan el anticuerpo en el medio de cultivo celular; (b) purificar el anticuerpo de los medios de cultivo celular; y (c) preparar cualquiera de las formulaciones arriba descritas.

La preparación de una formulación farmacéutica puede incluir la etapa adicional consistente en evaluar al menos una propiedad de un anticuerpo en la formulación, seleccionada entre el grupo que consiste en la estabilidad física, la estabilidad química y la actividad biológica.

Por ejemplo, se pueden cultivar células de mamíferos para la producción de anticuerpos, habiendo incorporado las células de mamíferos de forma estable en sus genomas ácidos nucleicos que codifican las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo 9E4 humanizado. Las células de mamífero útiles para este propósito incluyen células huésped que tienen incorporadas de forma estable en sus genomas una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de anticuerpo presentada como SEQ ID N°: 29 y una cadena pesada de anticuerpo presentada como SEQ ID N°: 31 o 32.

Para la producción de anticuerpos, los ácidos nucleicos descritos se incluyen en un vector. En algunos ejemplos, el vector contiene el ácido nucleico que codifica el anticuerpo murino 9E4, o una versión quimérica, recubierta o humanizada del mismo, unido operativamente a una secuencia de control adecuada capaz de realizar la expresión del ADN en una célula huésped. Dichas secuencias de control incluyen un promotor para realizar la transcripción (por ejemplo, un promotor constitutivo o un promotor inducible tal como se conocen en la técnica), una secuencia de operador opcional para controlar dicha transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión de ribosoma de ARNm adecuados, potenciadores, señales de poliadenilación y secuencias para controlar la terminación de la transcripción y traducción. El vector puede ser un plásmido, una partícula de fago (por ejemplo, un vector viral tal como vectores de adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, virus herpes, virus de la vaccinia, lentivirus, poxvirus y citomegalovirus), o simplemente un inserto genómico. Una vez transformados en un huésped adecuado, los ácidos nucleicos del anticuerpo se pueden integrar en el genoma del huésped, o el vector se puede replicar y funcionar independientemente del genoma del huésped.

Los ácidos nucleicos descritos se incluyen en un vector individualmente o en combinación (por ejemplo, una combinación de un ácido nucleico que codifica una cadena ligera de anticuerpo y un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de anticuerpo).

Las células huésped útiles para preparar formulaciones de anticuerpos de la invención incluyen células de mamífero, incluyendo células de origen humano, células de riñón embrionario humano, células de riñón de mono, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de ovario de hámster chino (CHO), células de Sertoli de ratón, células de carcinoma cervical humano (HeLa), células de riñón canino, células de pulmón humano, células de hígado humano, células de tumor mamario de ratón y células NS0.

Alternativamente es posible preparar un anticuerpo 9E4 quimérico, recubierto o humanizado mediante síntesis química y después usar el mismo en las formulaciones descritas.

Por regla general, los anticuerpos utilizados para preparar las formulaciones descritas están aislados o purificados, es decir, sustancialmente libres de material celular u otras proteínas contaminantes de las células en las que se

5 producen, o sustancialmente libres de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. Por ejemplo, un anticuerpo que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones del anticuerpo que tienen menos de aproximadamente un 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 5%, 2%, 1%, 0,5% , 0,1%, o menos (en peso seco) de proteína contaminante. Cuando un anticuerpo se produce de forma recombinante, también está sustancialmente libre de medio de cultivo, de modo que el medio de cultivo representa menos de aproximadamente un 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, o menos, del volumen de la preparación de proteína. Cuando un anticuerpo se produce por síntesis química, preferiblemente está sustancialmente libre o separado de precursores químicos u otros productos químicos que intervienen en la síntesis de la proteína. En consecuencia, dichas preparaciones de anticuerpos tienen menos de aproximadamente un 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1% o menos (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del principio activo de anticuerpo. Por ejemplo, algunas preparaciones del principio activo de anticuerpo tienen la siguiente pureza según la determinación mediante los siguientes ensayos: ELISA de proteína A (\leq aproximadamente 25 ng/mg), ELISA de CHOP (\leq aproximadamente 100 U²/mg), ELISA de IGF-1 (\leq aproximadamente 1 ng/mg), ELISA de insulina (\leq aproximadamente 1 ng/mg) y qPCR de ADN (\leq aproximadamente 3 pg/mg de proteína). Algunas preparaciones del principio activo de anticuerpo tienen una carga biológica de \leq aproximadamente 10 UFC/ml. Algunas preparaciones del principio activo de anticuerpo contienen \leq aproximadamente 0,5 EU/mg de endotoxinas bacterianas. Para la purificación del anticuerpo expresado de forma recombinante se puede utilizar cualquiera de una serie de métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad, tratamiento con ácido, filtración profunda, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, nanofiltración, ultrafiltración, diálisis y diafiltración.

El principio activo de anticuerpo purificado se puede ajustar a una solución que comprende cualquiera de las formulaciones descritas en la presente memoria, diluir a la concentración deseada y almacenar hasta que esté listo para su uso. Opcionalmente, la formulación se puede almacenar en forma concentrada hasta que esté lista para su uso.

25 Las formulaciones líquidas se pueden almacenar en forma congelada, bajo refrigeración o a temperatura ambiente, dependiendo de su perfil de estabilidad, que se puede determinar empíricamente. En algunos casos se aplica una etapa de filtración adicional. Algunas de las formulaciones descritas en la presente memoria se pueden liofilizar y almacenar en forma de polvo. Las formulaciones liofilizadas se pueden almacenar en forma congelada, bajo refrigeración o a temperatura ambiente, dependiendo de su perfil de estabilidad, que se puede determinar empíricamente. Por ejemplo, las formulaciones liofilizadas se pueden almacenar a una temperatura de aproximadamente 2 °C a 8 °C. En tales casos, la formulación se reconstituiría antes de la administración a un paciente para producir una formulación líquida que tenga el anticuerpo y los excipientes presentes en las concentraciones descritas en la presente memoria. En algunos casos, la formulación se reconstituye en agua estéril. En algunos casos, la formulación se reconstituye y se añade a una bolsa de infusión para su administración al paciente. La formulación reconstituida se puede almacenar bajo refrigeración o a temperatura ambiente antes de administrarla a un paciente durante un tiempo compatible con el perfil de estabilidad. Las técnicas de liofilización y reconstitución son conocidas y se describen en los Ejemplos.

40 Antes de la administración al paciente, una formulación líquida o una formulación liofilizada reconstituida se puede añadir a una bolsa de infusión que contiene un diluyente, tal como solución salina normal o solución de Ringer. El volumen de la bolsa de infusión suele ser relativamente grande (por ejemplo, de 50 ml a 1 l, o 100-500 ml) en comparación con el volumen de la formulación líquida o la formulación liofilizada reconstituida (por ejemplo, 1-10 ml). En la bolsa de infusión se pueden utilizar varios líquidos, como solución salina normal, solución lactato de Ringer o solución de dextrosa al 5%, cada uno de los cuales es sustancialmente isotónico. En un régimen ejemplar, se inyectan aproximadamente 5 ml de formulación líquida o liofilizada reconstituida a través del catéter de una bolsa de 45 100 ml de solución salina normal y se administran por infusión IV durante un período de aproximadamente una hora con un caudal de aproximadamente 1,75 ml/min.

Por lo tanto, la presente invención también abarca productos farmacéuticos que comprenden un principio activo de anticuerpo liofilizado e instrucciones para la reconstitución y uso. Este producto farmacéutico incluye: (a) un vial que comprende, en forma de polvo, aproximadamente 200 mg de anticuerpo, aproximadamente 25 mg de citrato de sodio deshidratado, aproximadamente 3,15 mg de ácido cítrico monohidrato, aproximadamente 435 mg de trehalosa deshidratada y aproximadamente 1 mg de polisorbato 20; (b) instrucciones para la reconstitución; y (c) instrucciones para preparar la formulación reconstituida para infusión, en donde (i) el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID N°: 29 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID N°: 32 con o sin la lisina C-terminal; y (ii) las instrucciones para la reconstitución requieren la reconstitución con agua para inyección hasta un volumen extraíble de 5 ml.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se han incluido para ilustrar modos de la invención. Determinados aspectos de los siguientes ejemplos se describen en términos de técnicas y procedimientos encontrados o contemplados por los presentes coinventores para que funcionen bien en la práctica de la invención. A la luz de la presente descripción y el nivel general de experiencia en la técnica, los expertos entienden que los siguientes ejemplos pretenden ser solo ejemplares y que se pueden emplear numerosos cambios, modificaciones y alteraciones sin apartarse del alcance

de la invención.

Ejemplo 1: Preparación del vector de expresión

5 Las secuencias específicas de 9E4 humanizado de las regiones variables tanto de cadena pesada como de cadena ligera (SEQ ID NOS: 32 y 29, respectivamente) se subclonaron en vectores de expresión que contienen elementos genéticos que permiten el enriquecimiento de grandes productores (por ejemplo, elemento potenciador de transcripción (TS), señales de poliadenilación, mutante de neomicina fosfotransferasa).

10 Utilizando el plásmido pCET Hu9E4VLv3.hCK como molde, la región variable de la cadena ligera se aisló mediante PCR, introduciendo en los extremos 5' de los fragmentos un sitio de restricción EcoRV y en los extremos 3' un sitio de restricción KpnI para subclonación en los vectores pBI-60 y pBI-90 digeridos con las mismas enzimas de restricción. Estos vectores contenían la región constante genómica de una cadena kappa humana. Además, los vectores pBI-60 y pBI-90 codifican el marcador de selección atenuado neomicina fosfotransferasa para el enriquecimiento de grandes productores durante la selección. El pBI-60 codifica el mutante F240I de la neomicina fosfotransferasa y el vector pBI-90 codifica el mutante D227V.

15 Utilizando el plásmido pCET Hu9E4VHv3.hlgG1 como molde, la región variable de la cadena pesada de 9E4 humanizado se aisló mediante PCR, introduciendo en los extremos 5' un sitio de restricción MfeI y en los extremos 3' un sitio de restricción BspI para subclonación. La región variable se clonó en el vector de expresión eucariota pBI-61 digerido con MfeI y BamHI, que contiene las regiones constantes genómicas de la IgG1 humana del alotipo G1m(3). El vector codifica el marcador seleccionable dihidrofolato reductasa (DHFR) de hámster.

Ejemplo 2: Producción de anticuerpo 9E4 humanizado

20 Los plásmidos pBI-61/9E4 HC y pBI-60/9E4 LC se cotransfectaron en células de ovario de hámster chino (CHO) preadaptadas a medios de cultivo libres de suero. Las células se cultivaron en medios químicamente definidos sin ningún componente de origen bovino. Los medios de cultivo para líneas celulares establecidas fueron los siguientes:

Medio de preinoculación:

| Componente | BI-Mat. nº | Conc./l |
|----------------------------------|------------|---------------------|
| WFI | 27259 | 0,80 l |
| GMBI211 | 80264 | 11,90 g |
| NaHCO3 | 23904 | 4,50 g |
| Suplemento III | 70994 | 1,80 g |
| Reserva insulina sol nº 2 pharma | 65422 | 2 ml |
| Glucosa anhidra | 29603 | 5,0 g |
| L-glucamina | 23516 | 1,45 g |
| Suplemento I | 71455 | 2,50 g |
| Ácido succínico | 42949 | 1,50 g |
| WFI | 27259 | 0,176 l |
| NaOH 40% | 26181 | según sea necesario |

25 Preparación del medio de preinoculación:

- 1) Volumen inicial de WFI 80% del volumen total; temperatura de inicio de 28 a 35 °C.
- 2) Añadir los componentes uno a uno, de acuerdo con la lista (arriba), en cuanto cada componente anterior se disuelva por completo.
- 3) Volumen restante de WFI 0,176 l/l de medio.
- 30 4) Antes de la filtración, ajustar el pH entre 7,00 y 7,20.
- 5) Antes de la filtración, la osmolaridad es de 280 a 320 mOsmol/kg.

Adiciones posteriores a la inoculación:

Medio de alimentación de nutrientes

Solución de glutamina al 3%

Solución de glucosa (500 g/l)

Solución de carbonato de sodio 1 M

Emulsión antiespuma al 2%

5 Medio de alimentación de nutrientes:

| Componente | BI-Mat. nº | Conc./l |
|-------------------------------------|------------|---------------------|
| WFI | 27259 | 0,70 l |
| GM BI 220 | 80265 | 76,60 g |
| Bicarbonato de sodio | 23904 | 1,50 g |
| Suplemento III | 70994 | 0,56 g |
| Reserva insulina sol nº 2 pharma | 65422 | 10 ml |
| Glucosa anhidra | 29603 | 83,40 g |
| Suplemento II | 71456 | 4,95 g |
| L-cisteína x HCl x H ₂ O | 55946 | 2,60 g |
| WFI | 27259 | 0,179 l |
| NaOH 40% | 26181 | según sea necesario |

Preparación del medio de alimentación de nutrientes:

- 1) Volumen inicial de WFI 70% del volumen total; temperatura de inicio de 30 a 40 °C.
- 2) Añadir los componentes uno a uno, de acuerdo con la lista (arriba), en cuanto cada componente anterior se disuelva por completo.
- 3) Volumen restante de WFI 0,179 l/l de medio.
- 4) Antes de la filtración, ajustar el pH entre 6,90 y 7,10.
- 5) Antes de la filtración, la osmolalidad es de 1.185 a 1.585 mOsmol/kg.

Filtración del medio:

15 Prefiltro - filtros de 0,2 µm

Filtro final - filtros de 0,1 µm

El anticuerpo se agrupó a partir de células transfectadas estables de las que se derivó finalmente la línea celular de producción. El material derivado de la agrupación se purificó mediante cromatografía de afinidad por la proteína A y otras técnicas de purificación, tal como se describe más abajo.

20 Ejemplo 3: Purificación de anticuerpos

La proteína A es una proteína bacteriana utilizada para la purificación por afinidad de anticuerpos 9E4 humanizados, recubiertos o quiméricos. Por regla general, la cromatografía de proteína A implica el paso de sobrenadante de cultivo celular clarificado sobre la columna con pH 6-8, bajo las condiciones en las que los anticuerpos se unen y los componentes no deseados, como las proteínas de la célula huésped, los componentes de los medios de cultivo celular y los virus putativos, fluyen a través de la columna. Se puede llevar a cabo una etapa de lavado intermedio opcional para eliminar de la columna las impurezas no unidas específicamente, seguida por la elución del producto con pH 2,5-4. Los tipos de resinas de proteína A clasificadas según la composición del esqueleto de resina incluyen vidrio o a base de sílice, por ejemplo Prosep vA, Prosep vA Ultra (Millipore); a base de agarosa, por ejemplo Protein A Sepharose Fast Flow, MabSelect (GE Healthcare); y polímero orgánico a base, por ejemplo, de poliestireno-divinilbenceno Poros A y MabCapture (Applied Biosystems). Se pueden utilizar diversos componentes de tampón de elución, como ácido acético, ácido cítrico, ácido fosfórico, arginina HCl y glicina HCl.

Los virus se pueden eliminar mediante tratamiento con pH bajo o filtración entre otros métodos. Los filtros actuales que retienen virus son ultrafiltros o microfiltros con poros muy pequeños. Las membranas de filtración de virus están

hechas de polietersulfona hidrófila (PES), polivinilideno hidrófilo (PVDF) y celulosa regenerada.

Los filtros de profundidad se utilizan en la clarificación de caldos de cultivo celular, para mantener la capacidad de filtros de membrana o para proteger columnas de cromatografía o filtros de virus. Por regla general, los filtros de profundidad están hechos de celulosa, un coadyuvante de filtración poroso como tierra de diatomeas y un aglutinante de resina cargado iónicamente. Los filtros de profundidad pueden emplear tanto la exclusión por tamaños como la unión por adsorción para realizar la separación.

La cromatografía de intercambio iónico utiliza resinas cargadas positiva o negativamente para unir proteínas sobre la base de sus cargas netas en un sistema tampón dado. Se pueden determinar condiciones (por ejemplo pH y fuerza iónica) que unen y liberan el anticuerpo diana con un alto grado de especificidad. A la inversa, se pueden encontrar condiciones que unen prácticamente todos los demás componentes de la muestra, excepto los anticuerpos. La cromatografía de intercambio aniónico utiliza un grupo cargado positivamente (débilmente básico, como dietilamino etilo, DEAE o dimetilamino etilo, DMAE; o fuertemente básico, como amino etilo cuaternario, Q o trimetilamonio etilo, TMAE o aminoetilo cuaternario, QAE).

La cromatografía de intercambio catiónico utiliza una resina modificada con grupos funcionales cargados negativamente. Se puede tratar de ligandos ácidos fuertes tales como grupos sulfopropilo, sulfoetilo y sulfoisobutilo o ligandos ácidos débiles tales como un grupo carboxilo. La cromatografía de intercambio catiónico se ha empleado en procesos de purificación para muchos anticuerpos monoclonales mAbs con valores pI de neutros a básicos. El anticuerpo se une a la resina durante la etapa de carga y se eluye a través de una conductividad aumentada o de un aumento del pH en el tampón de elución. Las impurezas relacionadas con el proceso cargadas negativamente, como el ADN, algunas proteínas de la célula huésped, la proteína A lixiviada y la endotoxina se eliminan en la carga y la fracción de lavado. La cromatografía de intercambio catiónico también puede separar productos desamidados, especies oxidadas y formas truncadas N-terminales, así como especies de alto peso molecular del anticuerpo deseado. La unión de anticuerpos en resinas de intercambio catiónico depende del pH y la conductividad y del tipo de resina. SP Sepharose FF y SP Sepharose XL son dos resinas comunes comercialmente disponibles.

La ultrafiltración es un proceso de membrana impulsado por presión para la concentración de anticuerpos y el intercambio de tampón. La ultrafiltración es una separación basada en el tamaño, en la que las especies más grandes que los poros de la membrana son retenidas y las especies más pequeñas atraviesan la membrana libremente. La separación en la ultrafiltración se logra a través de diferencias en las tasas de filtración de diferentes componentes a través de la membrana bajo una fuerza de impulso de presión dada. El intercambio de tampón se logra utilizando un modo de diafiltración en el que el tampón de la composición final deseada se añade al sistema de material retenido a la misma velocidad a la que se retira el filtrado, manteniendo así un volumen constante del material retenido. La ultrafiltración con poros de membrana dentro del intervalo de 1 a 20 nm puede proporcionar una separación de especies que varían en el peso molecular desde 500 daltons hasta 1.000 kilodaltons.

El producto de anticuerpo 9E4 se recogió del filtrado de la cosecha mediante cromatografía de afinidad por la rProteína-A utilizando resina MabSelect de GE Healthcare. El producto se une a la resina de proteína A con pH neutro y se eluye de modo isocrático con acetato de sodio 100 mM con pH 3,0. La mayoría de las impurezas de la célula huésped y los componentes del medio de cultivo celular se reducen durante esta etapa. Después se llevó a cabo una etapa de lavado independiente con tampón medio PAIN (NaCl 500 mM, KCl 1,34 mM, Na₂HPO₄ 4 mM x 2H₂O, KH₂PO₄ 0,735 mM x 2H₂O, 0,125% PVP = kollidon 17, 7,5% isopropanol, NaOH 4,3 mM, L-arginina-HCL 250 mM, pH 7,4, conductividad 45 mS/cm) para eliminar los componentes que todavía quedaban en la columna y para minimizar la turbidez en el conjunto de producto AT neutralizado. La etapa de la proteína A se llevó a cabo en un máximo de tres ciclos dividiendo el conjunto de la cosecha en cargas similares. La columna se equilibró a un pH 7,4 ± 0,2 y una conductividad de 16 ± 3 mS/cm con KH₂PO₄ 1,47 mM x 2H₂O, Na₂HPO₄ 8,03 mM x 2H₂O NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM para eliminar la solución de almacenamiento y preparar la columna para la carga. La columna se cargó después con un máximo de 30 g/l de filtrado de cosecha, se lavó (3 tampones, 3 volúmenes de columna en cada caso) y se eluyó. Después de la elución, la columna se somete a arrastre mediante ácido fosfórico 0,1 M y se equilibra para el siguiente ciclo, o se regenera por completo y se almacena si el próximo ciclo se realiza el día siguiente. Después del último ciclo se realiza una regeneración completa con ácido fosfórico 0,1 M (arrastre), urea 6 M y ácido acético 1 M.

El conjunto del producto de MabSelect agrupado y filtrado por 0,2 µm se ajusta a pH 3,5 con ácido acético 1 M (agitado) y se incuba durante 60-70 minutos a temperatura ambiente para la inactivación viral (sin agitación). Después se lleva a cabo una neutralización bajo agitación mediante adición de base tris 1 M con pH 5,50 ± 0,20.

El conjunto de producto tratado con ácido se pasa inmediatamente a la siguiente etapa de filtración profunda. La filtración profunda mediante Cuno Zeta Plus 60ZA es una etapa para eliminar turbideces. El conjunto de producto inactivado en cuanto a virus se filtra mediante un proceso de filtración de dos etapas que consiste en el material de filtro de profundidad arriba mencionado en serie con un filtro de membrana PES de 0,2 µm.

El conjunto del producto de filtración profunda se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico (AEX) utilizando resina Q-Sepharose Fast Flow de GE Healthcare en un modo de flujo continuo. La etapa de AEX reduce el ADN residual de la célula huésped y elimina virus. La columna se equilibró a un pH 7,50 ± 0,20 y

una conductividad de $8,0 \pm 1,0$ mS/cm con tampón de equilibrio Q (trometamol-HCl 42,8 mM base tris 7,2 mM, NaCl 39 mM) para eliminar la solución de almacenamiento y preparar la columna para la carga. Durante la carga, el producto fluyó a través de la columna mientras las impurezas se unían a la resina. Después de la carga/elución, la columna se lavó con tampón de equilibrio Q para recuperar el producto que quedaba en la fase móvil en la columna. Después de la recuperación del producto, la columna se regeneró y finalmente se almacenó.

El conjunto de producto de Q-Sepharose ajustado se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio catiónico (CEX) utilizando Poros HS50 de Applied Biosystems. El producto se unió a la columna en condiciones de baja salinidad (CH_3COONa 36,2 mM x $3\text{H}_2\text{O}$, CH_3COOH 13,8 mM, NaCl 58,5 mM, pH 5,1, conductividad 8 mS/cm) y después se eluyó de modo isocrático bajo condiciones de alta salinidad (CH_3COONa 38 mM x $3\text{H}_2\text{O}$, CH_3COOH 12 mM, NaCl 228 mM, pH 5,1, conductividad 25,5 mS/cm). Después se llevó a cabo una etapa de lavado adicional con una cantidad media de sal (CH_3COONa 37,2 mM x $3\text{H}_2\text{O}$, CH_3COOH 12,8 mM, NaCl 102,5 mM, pH 5,1, conductividad 13,5 mS/cm) para eliminar contaminantes tales como proteínas de la célula huésped, variantes de producto de alto peso molecular y proteína A lixiviada. La etapa CEX se realizó durante un máximo de 2 ciclos. En tales casos, el conjunto de AEX ajustado se separa en 2 volúmenes iguales y se procesa individualmente en la columna CEX.

La filtración de virus (VF) proporciona un segundo método ortogonal específicamente para la eliminación de partículas de virus y se diseñó para eliminar partículas mayores de 20 nm (por ejemplo Parvovirus). La filtración de virus se llevó a cabo a través de una transferencia de presión del conjunto de producto de Poros HS50 a través de un filtro previo de $0,1 \mu\text{m}$ y un filtro viral (Planova 20 N, Asahi Kasei) en serie, con una caída de presión de 1,0 bar a través del nanofiltro. El filtro de virus se sometió a prueba de integridad antes del uso (prueba de estanqueidad) y después del uso (prueba de estanqueidad y ensayo con partículas de oro).

El conjunto de producto nano-filtrado se concentró a ~ 20 g/l (UF1) y después se diafiltró a un volumen constante contra ≥ 6 volúmenes de tampón de diafiltración ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ 17 mM x $2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 3 mM x H_2O , pH 6, conductividad 4 mS/cm). Después de la diafiltración, el conjunto se concentró a ~ 75 g/l (UF2). Finalmente, el material retenido se retiró del sistema UF/DF mediante lavado con tampón de diafiltración a una concentración de ~ 52 g/l (= "conjunto de producto de 30 kD").

El conjunto de producto de 30 kD se mezcló en una relación 4 + 1 con 5 veces tampón de espiga de trehalosa/Tween20 (Polisorbato 20) ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ 17 mM x $2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 3 mM x H_2O , trehalosa 1.150 mM x $2 \text{H}_2\text{O}$, 1 g/l de polisorbato 20, pH 5,9, conductividad 1,0 mS/cm) y se diluyó con tampón de formulación ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ 17 mM x $2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 3 mM x H_2O , trehalosa 230 mM x $2 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l de polisorbato 20, pH 6,0, conductividad 3,30 mS/cm) para obtener una concentración de proteína de $40,0 \pm 2,0$ g/l.

El material en masa se filtró a través de un filtro de conjunto de $0,2 \mu\text{m}$ y un filtro de manga de $0,2 \mu\text{m}$ conectados en serie. Se puede implementar un prefiltro adicional al filtro de $0,2 \mu\text{m}$ para la eliminación de partículas. El filtro de conjunto de $0,2 \mu\text{m}$ se probó para determinar su integridad. Si el filtro de conjunto no pasa la prueba, cada filtro de manga se prueba por separado para verificar su integridad.

Ejemplo 4: Desarrollo de formulación

A lo largo de todo este ejemplo se utilizó el anticuerpo 9E4 humanizado que tenía la secuencia de cadena ligera de la SEQ ID N°: 29 y la secuencia de cadena pesada de la SEQ ID N°: 32.

Caracterización fisicoquímica. Para facilitar la selección de componentes de formulación potenciales, se determinaron las características térmicas del anticuerpo 9E4 humanizado. En el análisis se utilizaron las técnicas de calorimetría diferencial de barrido ("DSC"), dispersión de luz en ángulo recto ("RALS") y fluorescencia intrínseca ("IF"). El anticuerpo purificado se calentó primero de $10 \text{ }^\circ\text{C}$ a $71 \text{ }^\circ\text{C}$, después se enfrió de $71 \text{ }^\circ\text{C}$ a $10 \text{ }^\circ\text{C}$, después se calentó de nuevo de $10 \text{ }^\circ\text{C}$ a $83 \text{ }^\circ\text{C}$, después se enfrió otra vez de $83 \text{ }^\circ\text{C}$ a $10 \text{ }^\circ\text{C}$, y finalmente se calentó de nuevo de $10 \text{ }^\circ\text{C}$ a $95 \text{ }^\circ\text{C}$. El termograma de DSC reveló dos transiciones, la primera a $71 \text{ }^\circ\text{C}$ y la segunda a $83 \text{ }^\circ\text{C}$. Véase la Figura 1. La transición de $71 \text{ }^\circ\text{C}$ era reversible en las condiciones experimentales. Los termogramas de RALS y de IF revelaron una sola transición a una temperatura intermedia.

Optimización del pH. A continuación se analizó la estabilidad del 9E4 humanizado en un sistema tampón mixto con valores pH que oscilaban entre 3,5 y 8,0. De nuevo, en el análisis se utilizaron las técnicas de DSC, RALS e IF. Como antes, en el termograma de DSC se detectaron dos transiciones (con la excepción de una tercera transición detectada con pH 3,5) y en los termogramas de RALS y de IF se detectó una sola transición intermedia. La primera transición térmica en el análisis por DSC aumentó al aumentar el pH hasta un pH 6,5, momento en el que se estabilizó a aproximadamente $71 \text{ }^\circ\text{C}$ (Tabla 4, abajo, y Figura 2). La segunda transición térmica en el análisis de DSC alcanzó un máximo a aproximadamente $83 \text{ }^\circ\text{C}$, con un pH entre 5,0 y 6,5. La transición térmica en el análisis por RALS se mantuvo en aproximadamente $77 \text{ }^\circ\text{C}$ para el intervalo de pH de 4,5-8,0, y la transición térmica de IF varió entre $75 \text{ }^\circ\text{C}$ y $77 \text{ }^\circ\text{C}$ en el mismo intervalo de pH (Figura 2). Sobre la base de los resultados se determinó un intervalo de pH de 5,5 a 7,0 para proporcionar la mayor estabilidad para el anticuerpo 9E4 humanizado.

Tabla 4: Picos de transición térmica de DSC para 9E4 humanizado en función del pH

| pH | Tm1 (°C) | Tm* (°C) | Tm2 (°C) |
|-----|----------|----------|----------|
| 3,5 | 43,6 | 59,0 | 75,1 |
| 4,0 | 54,9 | -- | 79,8 |
| 4,5 | 59,2 | -- | 81,4 |
| 5,0 | 65,9 | -- | 82,7 |
| 5,5 | 68,8 | -- | 83,1 |
| 6,0 | 70,6 | -- | 83,0 |
| 6,5 | 71,3 | -- | 82,8 |
| 7,0 | 71,3 | -- | 82,3 |
| 7,5 | 71,3 | -- | 82,2 |
| 8,0 | 71,0 | -- | 82,0 |

5 Selección de tampón. Sobre la base de los resultados de estabilidad dependiente del pH para el anticuerpo 9E4 humanizado, se identificaron sistemas tampón que son farmacéuticamente aceptables para uso parenteral y que podrían proporcionar una capacidad de tampón suficiente en el intervalo de pH entre pH 5,5 y 7,0. Estos sistemas tampón incluían tampón de citrato 20 mM (pH 5,5; 6,0), tampón de histidina 20 mM (pH 6,0; 6,5; 7,0) y tampón de succinato 20 mM (pH 6,5). La estabilidad térmica del anticuerpo 9E4 humanizado en los tampones de succinato 20 mM y de histidina 20 mM se probó mediante DSC, RALS e IF. De acuerdo con la determinación por DSC, el anticuerpo 9E4 humanizado en el tampón de citrato, con un pH entre 5,5 y 6,0, mostró una segunda transición térmica significativamente mayor (Tm2) en comparación con el anticuerpo 9E4 humanizado en el tampón de histidina (Tabla 5, abajo). Por el contrario, el anticuerpo 9E4 humanizado en el tampón de histidina, con un pH entre 6,5 y 7,0, mostró una primera transición térmica (Tm1) más alta en comparación con el anticuerpo 9E4 humanizado en el tampón de citrato (Tabla 5). Utilizando la técnica RALS no se detectaron transiciones térmicas en el caso del anticuerpo tamponado con histidina. Sin embargo, el anticuerpo tamponado con citrato mostró una transición térmica a 78 °C con pH 5,5 y 6,0.

20 El anticuerpo 9E4 humanizado tamponado con succinato (pH 6,5) también se analizó mediante DSC y RALS y los resultados se compararon con anticuerpo tamponado con citrato (pH 6,5) y tamponado con histidina (pH 6,5). En el caso del análisis por DSC, la segunda transición térmica (Tm2) en los tampones de citrato y succinato fue aproximadamente 1 °C más alta que en el tampón de histidina, lo que indica una estabilidad ligeramente mayor de la proteína en las condiciones ensayadas. Mediante RALS se detectaron temperaturas de transición comparables para los tampones de succinato y citrato con pH 6,5.

Sobre la base de estos hallazgos se seleccionaron tampones de citrato 20 mM (pH 6,0) y succinato 20 mM (pH 6,5) para utilizarlos en la producción de un producto farmacéutico liofilizado y probar su estabilidad a largo plazo.

Tabla 5: Picos de transición térmica de DSC para 9E4 humanizado en función del tampón

| Tampón | Tm1 (°C) | Tm2 (°C) |
|--------------------|----------|----------|
| Citrato (pH 5,5) | 68,8 | 83,4 |
| Citrato (pH 6,0) | 70,2 | 83,2 |
| Histidina (pH 6,0) | 68,9 | 81,9 |
| Histidina (pH 6,5) | 71,3 | 81,9 |
| Histidina (pH 7,0) | 71,4 | 82,5 |
| Succinato (pH 6,5) | 71,8 | 82,8 |

25 Selección de azúcar/poliol. Con el objetivo de aumentar la estabilidad del anticuerpo 9E4 humanizado en una formulación liofilizada, se analizó la influencia de los azúcares y polioles en la estabilidad térmica del anticuerpo. Los azúcares/polioles evaluados incluían trehalosa, sacarosa o una mezcla de sacarosa y manitol. Se añadieron trehalosa 240 mM, sacarosa 240 mM y sacarosa 50 mM/manitol 200 mM en cada caso a tampones de succinato 20 mM (pH 6,5), histidina 20 mM (pH 6,5) y citrato 20 mM (pH 6,5). La estabilidad del anticuerpo 9E4 humanizado se evaluó después mediante DSC para cada una de las formulaciones. Los resultados de la DSC revelaron que los

diversos azúcares/poliolios cambiaron la primera y segunda transiciones térmicas a temperaturas más altas, lo que indica un efecto estabilizador (Tabla 6, abajo). Sin embargo, las formulaciones de trehalosa mostraban sistemáticamente las transiciones térmicas más altas (Tabla 6). Además, la segunda temperatura de transición (Tm2) en las formulaciones de histidina era menor que en las formulaciones de citrato y succinato (Tabla 6).

5 **Tabla 6:** Picos de transición térmica de DSC para 9E4 humanizado en función del tampón y el azúcar/poliol

| Formulación | Tm1 (°C) | Tm2 (°C) |
|---------------------------------------|----------|----------|
| Succinato (pH 6,5) + sacarosa/manitol | 72,6 | 83,6 |
| Succinato (pH 6,5) + sacarosa | 72,8 | 83,8 |
| Succinato (pH 6,5) + trehalosa | 72,9 | 83,9 |
| Histidina (pH 6,5) + sacarosa/manitol | 72,3 | 82,6 |
| Histidina (pH 6,5) + sacarosa | 72,6 | 82,8 |
| Histidina (pH 6,5) + trehalosa | 72,6 | 83,0 |
| Citrato (pH 6,5) + sacarosa/manitol | 71,9 | 83,4 |
| Citrato (pH 6,5) + sacarosa | 72,1 | 83,7 |
| Citrato (pH 6,5) + trehalosa | 72,5 | 83,7 |

10 También se llevaron a cabo mediciones por RALS en anticuerpos 9E4 humanizados formulados con los diversos azúcares/poliolios en tampón de succinato o citrato (pH 6,5). En el caso del tampón de succinato, la formulación de trehalosa 240 mM tenía la temperatura de transición más alta (77 °C), la formulación de sacarosa 240 mM tenía una temperatura de transición intermedia (76 °C) y la formulación de sacarosa 50 mM/manitol 200 mM tenía la temperatura de transición más baja (75 °C). En el caso del tampón de citrato, la formulación de trehalosa 240 mM y la formulación de sacarosa 50 mM/manitol 200 mM tenían la misma temperatura de transición (78 °C), y la formulación de sacarosa 240 mM tenía una temperatura de transición más baja (77 °C). La diferencia de solo 1 °C en la transición térmica en el caso de las formulaciones de citrato estaba dentro de la variabilidad de la prueba.

15 Agente tensioactivo. El efecto del polisorbato 20 ("PS20") en la estabilidad térmica se examinó utilizando DSC y se determinó que el mismo no tiene ningún impacto en las temperaturas de transición del anticuerpo 9E4 humanizado. Sin embargo, se observó un efecto positivo del PS20 con respecto a la tensión por agitación. Se analizaron dos formulaciones para determinar su reacción a la tensión por agitación: (A) citrato 20 mM, pH 6,0, trehalosa 230 mM, 0,02% (p/p) PS20; y (B) citrato 25 mM, pH 6,0, trehalosa 230 mM. La formulación con PS20 (Formulación A) proporcionaba un menor grado de formación de espuma y un nivel de turbidez constante incluso después de 24 horas de agitación. La Formulación B presentaba una fuerte formación de espuma y un aumento de la turbidez después de 3 horas de agitación. Ninguna de las dos formulaciones condujo a la generación de partículas visibles durante el estudio de agitación.

25 A continuación se evaluó el efecto del PS20 en la turbidez de la formulación inducida por agitación. La turbidez de la Formulación A no aumentó ni siquiera después de 24 horas de agitación. En cambio, la turbidez de la Formulación B prácticamente se duplicó, aumentando de 17 FNU (Unidades Nefelométricas de Formazina) antes de la agitación a 32 FNU después de 24 horas de agitación (Tabla 7).

Tabla 7: Turbidez (FNU) de formulaciones de anticuerpo 9E4 humanizado antes y después de la agitación

| | Valor inicial | 3 horas | 6 horas | 24 horas |
|---------------|---------------|---------|---------|----------|
| Formulación A | 18 | 18 | 18 | 18 |
| Formulación B | 17 | 20 | 25 | 32 |

30 Las mediciones de agregación de anticuerpos antes y después de la agitación evidencian de modo similar un efecto estabilizador del PS20. La cantidad de anticuerpo monomérico y agregado en las Formulaciones A y B se evaluó mediante cromatografía de exclusión por tamaños de alto rendimiento (HPSEC) antes de la agitación y después de 3, 6 y 24 horas de agitación. La presencia de PS20 en la Formulación A estaba en correlación con un ligero aumento (0,2%) en la cantidad de anticuerpo agregado (Tabla 8) y una disminución correspondiente (0,2%) en la cantidad de anticuerpo monomérico (Tabla 9). En cambio, la Formulación B (sin PS20) presentaba un aumento cuatro veces mayor en el anticuerpo agregado (Tabla 8) y una disminución correspondientemente elevada (0,9%) en la cantidad de anticuerpo monomérico (Tabla 9).

Tabla 8: Agregación de anticuerpo 9E4 humanizado (%) antes y después de la agitación

| | Valor inicial | 3 horas | 6 horas | 24 horas |
|---------------|---------------|---------|---------|----------|
| Formulación A | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,8 |
| Formulación B | 2,5 | 2,7 | 3,0 | 3,3 |

Tabla 9: Nivel de monómeros de anticuerpo 9E4 humanizado (%) antes y después de la agitación

| | Valor inicial | 3 horas | 6 horas | 24 horas |
|---------------|---------------|---------|---------|----------|
| Formulación A | 97,2 | 97,1 | 97,1 | 97,0 |
| Formulación B | 97,2 | 97,0 | 96,7 | 96,3 |

- 5 Por lo tanto, los resultados del estudio de agitación revelaron que el PS20 previene aumentos no deseables en la turbidez y en la agregación de anticuerpos en formulaciones de anticuerpo 9E4 humanizado.

Estudio de viabilidad de liofilización. Sobre la base de los anteriores análisis se seleccionaron las formulaciones 1-4 (Tabla 10, abajo) para evaluar la viabilidad de almacenamiento del anticuerpo 9E4 humanizado en forma liofilizada.

Tabla 10: Formulaciones de ensayo de anticuerpo 9E4 humanizado

| ID de la formulación | Descripción de la formulación |
|----------------------|--|
| F1 | 40 mg/ml de anticuerpo 9E4 humanizado, succinato 20 mM, trehalosa 230 mM, polisorbato 20 al 0,02% en peso, pH 6,5 |
| F2 | 40 mg/ml de anticuerpo 9E4 humanizado, succinato 20 mM, sacarosa 28 mM, manitol 212 mM, polisorbato 20 al 0,02% en peso, pH 6,5 |
| F3 | 40 mg/ml de anticuerpo 9E4 humanizado, citrato 20 mM, trehalosa 230 mM, polisorbato 20 al 0,02% en peso, pH 6,0 |
| F4 | 40 mg/ml de anticuerpo 9E4 humanizado, citrato 20 mM, sacarosa 28 mM, manitol 212 mM, polisorbato 20 al 0,02% en peso, pH 6,0 |

10

Como una etapa inicial en el desarrollo de un ciclo de liofilización se estudiaron las propiedades térmicas de las formulaciones F1-F4 congeladas. Se utilizó un instrumento Mettler Toledo DSC 821 para determinar la temperatura de transición vítrea (T_g) de cada una de las formulaciones. Las mediciones se realizaron durante el siguiente ciclo

ES 2 704 440 T3

de congelación/descongelación:

Congelación: de 5 °C a 70 °C a 5 K/min.

Mantenimiento: 3 minutos a -70 °C.

Calentamiento: de -70 °C a 25 °C a 5 K/min.

- 5 La Tabla 11 enumera las temperaturas de transición vítrea identificadas de este modo. Las Formulaciones 2 y 4 (que incluyen sacarosa y manitol) presentan una Tg' más baja en comparación con las formulaciones de trehalosa, mientras que el uso de diferentes tampones no tuvo ningún impacto significativo en la Tg'. Debido a su mayor Tg', las formulaciones de trehalosa (Formulaciones 1 y 3) pueden soportar una mayor temperatura del producto durante el secado primario, lo que resulta favorable para el proceso de liofilización.

10 **Tabla 11:** Temperaturas de transición vítrea correspondientes a las Formulaciones F1 a F4

| Formulación | Tg' (comienzo) | Tg' (punto medio) |
|-------------|----------------|-------------------|
| F1 | -27 °C | -26 °C |
| F2 | -35 °C | -34 °C |
| F3 | -36 °C | -25 °C |
| F4 | -34 °C | -33 °C |

- 15 Sobre la base de las temperaturas de transición vítrea determinadas se desarrollaron y ensayaron dos ciclos de liofilización diferentes. El primer ciclo incluye una etapa de secado primario que se lleva a cabo a -10 °C (temperatura de almacenamiento) (Tabla 12). La etapa de secado primario en el segundo ciclo se lleva a cabo a -20 °C (temperatura de almacenamiento) (Tabla 13).

Tabla 12: Ciclo de liofilización 1 para el estudio de la viabilidad de liofilización

| | Etapa nº | Tiempo (hh:mm) | Temperatura (°C) | Vacío MKS (mbar) |
|--------------------------|----------|----------------|------------------|------------------|
| Carga | 01 | --- | 5 | Apagado |
| Congelación | 02 | 01:30 | 5 | Apagado |
| | 05 | 02:00 | -50 | Apagado |
| | 06 | 01:00 | -50 | Apagado |
| | 07 | 00:30 | -50 | Apagado |
| Secado primario | 08 | 00:01 | -50 | 0,10 |
| | 09 | 01:30 | -10 | 0,10 |
| | 10 | 60:00 | -10 | 0,10 |
| Secado secundario | 11 | 02:00 | 30 | 0,10 |
| | 12 | 08:00 | 30 | 0,10 |
| Tiempo total | | 76:31 | | |

Tabla 13: Ciclo de liofilización 2 para el estudio de la viabilidad de liofilización

| | Etapa nº | Tiempo (hh:mm) | Temperatura (°C) | Vacío MKS (mbar) |
|------------------------|----------|----------------|------------------|------------------|
| Carga | 01 | --- | 5 | Apagado |
| Congelación | 02 | 01:30 | 5 | Apagado |
| | 05 | 02:00 | -50 | Apagado |
| | 06 | 01:00 | -50 | Apagado |
| | 07 | 00:30 | -50 | Apagado |
| Secado primario | 08 | 00:01 | -50 | 0,10 |

| | Etapa nº | Tiempo (hh:mm) | Temperatura (°C) | Vacío MKS (mbar) |
|--------------------------|----------|----------------|------------------|------------------|
| | 09 | 01:30 | -20 | 0,10 |
| | 10 | 45:00 | -20 | 0,10 |
| Secado secundario | 11 | 04:00 | 30 | 0,10 |
| | 12 | 08:00 | 30 | 0,10 |
| Tiempo total | | 63:31 | | |

- 5 El estudio de viabilidad de liofilización se llevó a cabo a pequeña escala utilizando un Epsilon 2-12D, GT-12-B Lyophilizer (Christ). Después de una filtración de 0,2 µm, se añadieron partes alícuotas de 5,4 ml ± 0,2 ml de anticuerpo formulado a viales de 20 ml (viales de vidrio transparente Tipo I, 20/25 ml, Blow Back, de Schott). Los
- 10 viales resultantes tenían un volumen de llenado nominal de 5,0 ml y una dosis nominal de 200 mg/vial. El volumen de reconstitución previsto después de la liofilización era de 5,0 ml de agua. Los viales se cargaron manualmente en el liofilizador y se liofilizaron de acuerdo con el ciclo 1 o el ciclo 2. La temperatura del producto se controló utilizando sensores PT100 dispuestos en viales. Los ciclos se llevaron a cabo sin ninguna desviación. Las formulaciones se sobreenfriaron a una temperatura mínima de -6,5 °C antes de la cristalización del agua, tras lo cual las formulaciones se congelaron a -50 °C. Para la fase de secado primario se aplicó un vacío de 0,10 mbar (manómetro de capacidad), a una temperatura de almacenamiento de -10 °C (ciclo 1) o de -20 °C (ciclo 2). En el caso del ciclo 1, estos parámetros condujeron a una temperatura media del producto de -28 °C a -25 °C durante la sublimación. En el caso del ciclo 2, estos parámetros condujeron a una temperatura media del producto por debajo de -30 °C durante la sublimación. La duración real del secado primario fue de aproximadamente 40 horas para ambos ciclos. Después
- 15 del secado primario, la temperatura de almacenamiento se aumentó a 30 °C (secado secundario) para permitir la desorción del agua no congelada. La fase de secado secundario se estableció durante un período de 8 horas, con el objetivo de que las formulaciones liofilizadas tuvieran un nivel de humedad final de aproximadamente un 1%. Después de la liofilización, los viales se taparon (Stelmi C1404 6720GC 6 TP3, 20 mm) y se precintaron (precinto de aluminio de tipo *flip-off*, 20 mm).
- 20 Las formulaciones que contenían trehalosa eran completamente amorfas después de la liofilización y mostraban cierta contracción. En cambio, las formulaciones que contenían manitol eran parcialmente cristalinas y no mostraban contracción. La altura de la torta para todas las formulaciones era de aproximadamente 11 mm. La masa de la torta era de aproximadamente 685 mg (F1), 516 mg (F2), 700 mg (F3) y 520 mg (F4). En todas las formulaciones, la torta tenía un color ligeramente amarillo.
- 25 Las características de las formulaciones liofilizadas producidas mediante el ciclo 1 y el ciclo 2 se analizaron y se compararon, incluyendo los niveles de humedad, el tiempo de reconstitución y el número de partículas microscópicas. Véase la Tabla 14 (abajo). Además, la calidad de las formulaciones liofilizadas se comparó con la calidad del producto antes de la liofilización. Las características adicionales probadas incluían claridad, pH, osmolaridad, cantidad de monómero frente a agregado, densidad, patrón de HIC y actividad (datos no mostrados).
- 30 En general, no se observó ninguna influencia negativa en la calidad del producto después de la liofilización y la reconstitución: el proceso de liofilización no alteró significativamente el aspecto del producto, el color, el nivel de partículas visibles, la claridad, el pH, la osmolaridad, el contenido de proteínas, el contenido de monómeros, el patrón de HIC y la actividad. Además, los tiempos de reconstitución en el caso de las formulaciones liofilizadas tanto mediante el ciclo 1 (100-140 segundos) como mediante el ciclo 2 (100-700 segundos) eran aceptables, y los niveles
- 35 de partículas microscópicas medidos estaban por debajo de las especificaciones de la farmacopea.

Tabla 14: Resultados del estudio de viabilidad de liofilización, pruebas de productos después de la liofilización

| | Formulación | Aspecto de la torta | Humedad (%) | Partículas microscópicas (por 1 ml) | Tiempo de reconstitución (segundos) |
|----------------|-------------|----------------------------------|-------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Ciclo 1 | F1 | amarillo/marrón poca contracción | 1,09 | 43 (≥ 10 µm) 1 (≥ 25 µm) | 123 |
| | F2 | amarillo/marrón sin contracción | 1,77 | 83 (≥ 10 µm) 4 (≥ 25 µm) | 97 |
| | F3 | amarillo/marrón poca contracción | 1,48 | 21 (≥ 10 µm) 1 (≥ 25 µm) | 139 |
| | F4 | amarillo/marrón sin contracción | 1,94 | 59 (≥ 10 µm) 1 (≥ 25 µm) | 104 |

| | Formulación | Aspecto de la torta | Humedad (%) | Partículas microscópicas (por 1 ml) | Tiempo de reconstitución (segundos) |
|----------------|-------------|---|-------------|--|-------------------------------------|
| Ciclo 2 | F1 | amarillo/marrón poca contracción | 1,07 | 236 ($\geq 10 \mu\text{m}$) 4 ($\geq 25 \mu\text{m}$) | 104 |
| | F2 | amarillo/marrón sin contracción | 1,68 | 276 ($\geq 10 \mu\text{m}$) 8 ($\geq 25 \mu\text{m}$) | 104 |
| | F3 | amarillo/marrón poca contracción | 1,32 | 262 ($\geq 10 \mu\text{m}$) 3 ($\geq 25 \mu\text{m}$) | 166 |
| | F4 | amarillo/marrón sin contracción, el mejor aspecto | 1,62 | 190 ($\geq 10 \mu\text{m}$) 5 ($\geq 25 \mu\text{m}$) | 173 |

Debido a la tendencia del ciclo de liofilización 2 a dar como resultado tiempos de reconstitución más largos y niveles de partículas microscópicas ligeramente más altos (2-10 μm) en el caso de las formulaciones que contienen manitol y sacarosa, se seleccionó un ciclo de liofilización basado en una revisión del ciclo 1 para emplearlo en un estudio de estabilidad acelerada. El ciclo de liofilización revisado incluía una fase de secado primario más corta (etapa 8) de 40 horas en lugar de 60 horas, y una fase de secado secundario prolongada (etapa 10) de 12 horas en lugar de 8 horas. La fase de secado secundario más larga se incluyó para reducir aún más los niveles de humedad en las formulaciones liofilizadas.

Estudio de estabilidad acelerada de formulaciones liofilizadas. Las formulaciones F1-F4 (tal como se describe más arriba en la Tabla 10) se liofilizaron como se describe más arriba, excepto que se empleó el ciclo de liofilización que se muestra en la Tabla 15 (abajo). Para el estudio de estabilidad acelerada, las formulaciones liofilizadas se almacenaron a 40 °C, 75% de humedad relativa (HR) durante un periodo de uno, dos o tres meses. Después del almacenamiento, las formulaciones se reconstituyeron con agua (5,0 ml) y las características de las formulaciones reconstituidas se examinaron y se compararon con las características de las formulaciones reconstituidas inmediatamente después de la liofilización (los "valores iniciales").

Tabla 15: Ciclo de liofilización para el estudio de estabilidad acelerada

| | Etapa nº | Tiempo (hh:mm) | Temperatura (°C) | Vacío MKS (mbar) |
|--------------------------|----------|----------------|------------------|------------------|
| Carga | 01 | --- | 5 | Apagado |
| Congelación | 02 | 01:30 | 5 | Apagado |
| | 05 | 02:00 | -50 | Apagado |
| | 06 | 01:00 | -50 | Apagado |
| | 07 | 00:30 | -50 | Apagado |
| Secado primario | 08 | 00:05 | -50 | 0,10 |
| | 09 | 01:30 | -10 | 0,10 |
| | 10 | 40:00 | -10 | 0,10 |
| Secado secundario | 11 | 04:00 | 30 | 0,10 |
| | 12 | 12:00 | 30 | 0,10 |
| Tiempo total | | 62:35 | | |

El color de la torta de las formulaciones liofilizadas era ligeramente amarillo, en consonancia con las observaciones del estudio de viabilidad de la liofilización. El aspecto de la torta en todos los casos era aceptable, tendiendo las formulaciones de trehalosa (F1 y F3) a reducirse debido al carácter amorfo del producto liofilizado (confirmado por difracción de rayos X de polvos). Las formulaciones liofilizadas que contenían manitol (F2 y F4) eran parcialmente cristalinas y esencialmente no mostraban ninguna contracción. El aspecto de la torta y el color de las formulaciones no cambiaron durante el transcurso del almacenamiento durante tres meses a 40 °C.

El nivel de humedad de las formulaciones liofilizadas antes de la reconstitución no cambió significativamente después de tres meses a 40 °C. Los niveles de humedad de las formulaciones inmediatamente después de la liofilización estaban dentro del intervalo de un 0,90% a un 1,36%; después de tres meses estaban dentro del intervalo de un 0,84% a un 1,47%. Véase la Tabla 16 (abajo). Las diferencias en los niveles de humedad observados

en diferentes muestras de la misma formulación se atribuyen a la variación en el método de prueba. Sin embargo, las formulaciones que contienen sacarosa y manitol contenían sistemáticamente niveles más altos de humedad que las formulaciones que contenían trehalosa.

Tabla 16: Niveles de humedad de formulaciones liofilizadas después del almacenamiento a 40 °C

| Formulación | F1 succinato 20 mM trehalosa 230 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,5 | F2 succinato 20 mM sacarosa 28 mM manitol 212 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,5 | F3 citrato 20 mM trehalosa 230 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,0 | F4 citrato 20 mM sacarosa 28 mM manitol 212 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,0 |
|----------------------|--|--|--|--|
| Valor inicial | 0,90 | 1,13 | 1,11 | 1,36 |
| 1 mes | 0,85 | 1,18 | 0,94 | 1,48 |
| 2 meses | 0,85 | 1,12 | 0,68 | 1,24 |
| 3 meses | 0,84 | 1,22 | 0,90 | 1,47 |

5 Los tiempos de reconstitución de todas las formulaciones liofilizadas eran aceptables, variando entre 49 y 97 segundos. El aspecto de todas las formulaciones reconstituidas era comparable, sin que se observaran partículas visibles ni siquiera después de tres meses a 40 °C. Además, el color de las formulaciones se mantenía sin cambios (<BY5) durante el mismo período de tiempo, en comparación con las formulaciones prelioofilizadas.

10 No se observaron cambios relevantes en la concentración de proteína, la osmolaridad y el pH en ninguna de las formulaciones después de tres meses a 40 °C (datos no mostrados). Sin embargo, se observaron incrementos diferenciales en la turbidez. Tal como se muestra en la Tabla 17 (abajo), las formulaciones que contenían manitol (F2 y F4) presentaban mayores incrementos de la turbidez (6-7 FNU durante tres meses), mientras que las formulaciones que contenían trehalosa (F1 y F3) presentaban menores incrementos (solo 2 FNU).

15 **Tabla 17:** Turbidez de las formulaciones tras la liofilización y después de almacenamiento a 40 °C

| Formulación | F1 succinato 20 mM trehalosa 230 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,5 | F2 succinato 20 mM sacarosa 28 mM manitol 212 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,5 | F3 citrato 20 mM trehalosa 230 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,0 | F4 citrato 20 mM sacarosa 28 mM manitol 212 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,0 |
|----------------------|--|--|--|--|
| Valor inicial | 14 | 16 | 15 | 16 |
| 1 mes | 14 | 17 | 15 | 16 |
| 2 meses | 14 | 18 | 15 | 18 |
| 3 meses | 16 | 23 | 17 | 22 |

20 Las partículas microscópicas en las formulaciones reconstituidas se midieron mediante el método de imágenes de microflujo (MFI). Se midieron dos muestras individuales por formulación y punto temporal. Los niveles de partículas microscópicas en las formulaciones reconstituidas justo después de la liofilización (es decir, sin almacenamiento a 40 °C) se muestran en la Tabla 18 (abajo), con un gráfico de barras correspondiente mostrado en la Figura 3. Los niveles de partículas microscópicas detectados en formulaciones almacenadas durante un mes, dos meses y tres meses a 40 °C se muestran en las Tablas 19-21, respectivamente (véase más abajo), con los gráficos de barras correspondientes mostrados en las Figuras 4-6, respectivamente.

Tabla 18: Datos de MFI, valores iniciales después de la liofilización

| Tamaño de partícula (µm) | F1-1 | F1-2 | F2-1 | F2-2 | F3-1 | F3-2 | F4-1 | F4-2 |
|--------------------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|
| ≥ 2,00 | 2.340 | 2.730 | 11.470 | 11.545 | 10.375 | 11.285 | 2.820 | 2.280 |
| ≥ 10,00 | 110 | 70 | 55 | 50 | 70 | 135 | 25 | 0 |
| ≥ 25,00 | 10 | 30 | 0 | 10 | 10 | 20 | 10 | 0 |

Tabla 19: Datos de MFI, valores después de 1 mes de almacenamiento a 40 °C

| Tamaño de partícula (µm) | F1-1 | F1-2 | F2-1 | F2-2 | F3-1 | F3-2 | F4-1 | F4-2 |
|--------------------------|--------|--------|---------|---------|-------|-------|---------|---------|
| ≥ 2,00 | 12.370 | 12.680 | 232.490 | 218.280 | 7.245 | 7.715 | 184.365 | 176.815 |
| ≥ 10,00 | 50 | 10 | 28.990 | 33.455 | 130 | 105 | 3.885 | 3.925 |
| ≥ 25,00 | 0 | 0 | 0 | 2.955 | 0 | 20 | 0 | 0 |

Tabla 20: Datos de MFI, valores después de 2 meses de almacenamiento a 40 °C

| Tamaño de partícula (µm) | F1-1 | F1-2 | F2-1 | F2-2 | F3-1 | F3-2 | F4-1 | F4-2 |
|--------------------------|--------|--------|------|---------|--------|--------|---------|---------|
| ≥ 2,00 | 32.995 | 38.225 | 0 | 395.570 | 16.615 | 32.445 | 172.010 | 163.020 |
| ≥ 10,00 | 410 | 1.050 | 0 | 51.030 | 45 | 525 | 9.775 | 8.160 |
| ≥ 25,00 | 35 | 115 | 0 | 125 | 0 | 75 | 0 | 75 |

5

Tabla 21: Datos de MFI, valores después de 3 meses de almacenamiento a 40 °C

| Tamaño de partícula (µm) | F1-1 | F1-2 | F2-1 | F2-2 | F3-1 | F3-2 | F4-1 | F4-2 |
|--------------------------|--------|--------|---------|---------|--------|--------|---------|---------|
| ≥ 2,00 | 41.895 | 81.355 | 520.555 | 551.750 | 30.740 | 29.275 | 340.450 | 353.695 |
| ≥ 10,00 | 285 | 330 | 60.565 | 74.430 | 65 | 55 | 25.150 | 24.760 |
| ≥ 25,00 | 10 | 0 | 645 | 820 | 0 | 0 | 35 | 55 |

10

15

El análisis de MFI reveló que los niveles de partículas microscópicas en las formulaciones ensayadas eran comparables justo después de la liofilización, pero que los niveles en las formulaciones que contenían manitol y sacarosa (F2 y F4) aumentaban drásticamente después de un mes, y luego seguían aumentando. Como resultado de ello, la formulación 2 excedía los límites de la Farmacopea para partículas microscópicas mayores o iguales a 10 micras ($\geq 10,00 \mu\text{m}$) y partículas microscópicas mayores o iguales a 25 micras ($\geq 25,00 \mu\text{m}$) después de solo un mes, la formulación 4 excedía los límites de la Farmacopea para partículas microscópicas después de dos meses de almacenamiento a 40 °C. En cambio, las formulaciones que contenían trehalosa (F1 y F3) no mostraban ningún aumento significativo en la formación de partículas y se mantenían por debajo de los límites de la Farmacopea para partículas microscópicas durante al menos tres meses a 40 °C.

20

Las partículas microscópicas de las cuatro formulaciones también se midieron por oscurecimiento de la luz después de dos meses de almacenamiento a 40 °C. El oscurecimiento de la luz es una técnica que se sabe que da resultados diferentes a las mediciones de MFI, tendiendo normalmente a ser más bajos. Tal como se muestra en la Tabla 22 (abajo), la formulación 2 tiene los niveles más altos de partículas microscópicas detectadas por el oscurecimiento de la luz, mientras que las otras formulaciones tienen niveles de partículas microscópicas más bajos y más comparables.

Tabla 22: Datos de oscurecimiento de la luz, valores después de 2 meses de almacenamiento a 40 °C

| | F1 succinato 20 mM trehalosa 230 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,5 | | F2 succinato 20 mM sacarosa 28 mM manitol 212 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,5 | | F3 citrato 20 mM trehalosa 230 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,0 | | F4 citrato 20 mM sacarosa 28 mM manitol 212 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,0 | |
|---------------------------------|--|---------|--|---------|--|---------|--|---------|
| Tamaño de partícula (µm) | ≥ 10,00 | ≥ 25,00 | ≥ 10,00 | ≥ 25,00 | ≥ 10,00 | ≥ 25,00 | ≥ 10,00 | ≥ 25,00 |
| Valor inicial | 85 | 5 | 55 | 5 | 275 | 5 | 60 | 0 |
| 2 meses | 115 | 5 | 600 | 5 | 280 | 15 | 100 | 0 |

5 Las formulaciones también se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaños de alto rendimiento (HP-SEC) para determinar el porcentaje de anticuerpo en forma agregada y monomérica después del almacenamiento a 40 °C en estado liofilizado. Tal como se muestra en la Tabla 23 (abajo), el porcentaje de anticuerpo agregado aumentaba en un 2,5% a un 4,4% en las formulaciones que contenían manitol y sacarosa, mientras que solo aumentaba en un 1,0% a un 1,1% en las formulaciones que contenían trehalosa. A medida que aumentaban los niveles de anticuerpo agregado en las formulaciones, el porcentaje de anticuerpo monomérico disminuía de manera correspondiente. Véase la Tabla 24. En la Figura 7 se muestra una representación gráfica de la cantidad de anticuerpo monomérico en función de la formulación y el tiempo de almacenamiento a 40 °C.

Tabla 23: Agregación de anticuerpo (porcentaje) después del almacenamiento a 40 °C

| Formulación | F1 succinato 20 mM trehalosa 230 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,5 | F2 succinato 20 mM sacarosa 28 mM manitol 212 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,5 | F3 citrato 20 mM trehalosa 230 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,0 | F4 citrato 20 mM sacarosa 28 mM manitol 212 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,0 |
|---------------|---|--|---|--|
| Valor inicial | 2,4 | 2,8 | 2,0 | 2,2 |
| 1 mes | 2,9 | 5,0 | 2,5 | 3,6 |
| 2 meses | 3,1 | 6,0 | 2,8 | 4,1 |
| 3 meses | 3,4 | 7,2 | 3,1 | 4,7 |

10

Tabla 24: Anticuerpo monomérico (porcentaje) después del almacenamiento a 40 °C

| Formulación | F1 succinato 20 mM trehalosa 230 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,5 | F2 succinato 20 mM sacarosa 28 mM manitol 212 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,5 | F3 citrato 20 mM trehalosa 230 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,0 | F4 citrato 20 mM sacarosa 28 mM manitol 212 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,0 |
|---------------|---|--|---|--|
| Valor inicial | 96,9 | 96,4 | 97,1 | 97,0 |
| 1 mes | 96,4 | 94,2 | 96,7 | 95,5 |
| 2 meses | 96,1 | 93,2 | 96,4 | 95,1 |
| 3 meses | 95,9 | 92,1 | 96,2 | 94,6 |

15 Las formulaciones también se caracterizaron mediante cromatografía de interacción de hidrofobicidad (HIC) a lo largo de su almacenamiento a 40 °C. Para cada formulación, mediante la HIC se puede detectar un pico previo (relativamente hidrófilo), un pico principal y un pico posterior (relativamente hidrófobo). Los cambios en la estructura de la proteína a lo largo del tiempo se pueden controlar a través de los cambios en el área de cada uno de los picos que se producen. Los resultados del análisis HIC se muestran en las Tablas 25-27 (abajo). El cambio en el área del pico previo era comparable en cada una de las formulaciones. Los cambios en las áreas del pico principal y del pico posterior eran más significativos, diferenciándose entre las formulaciones que contenían trehalosa y las que contenían manitol/sacarosa. En particular, las formulaciones que contenían manitol/sacarosa (F2 y F4) presentaban disminuciones de un 8,4% y un 5,4% en el área del pico principal, respectivamente, durante el período de almacenamiento de tres meses. En cambio, las formulaciones que contenían trehalosa (F1 y F3) mostraban disminuciones de un 4,7% y un 4,5% en el área del pico principal, respectivamente, durante el mismo período de tiempo. La mayor parte de la proteína que se encontraba previamente en el pico principal de las formulaciones que contenían manitol/sacarosa se desplazó al pico posterior hidrófobo, aumentando las áreas de pico posterior de las formulaciones F2 y F4 en un 6,4% y un 4,6%, respectivamente.

Tabla 25: Datos de HIC, área de pico previo (porcentaje) después del almacenamiento a 40 °C

| Formulación | F1 succinato 20 mM trehalosa 230 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,5 | F2 succinato 20 mM sacarosa 28 mM manitol 212 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,5 | F3 citrato 20 mM trehalosa 230 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,0 | F4 citrato 20 mM sacarosa 28 mM manitol 212 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,0 |
|---------------|---|--|---|--|
| Valor inicial | 7,4 | 7,3 | 8,3 | 8,4 |
| 1 mes | 7,6 | 7,8 | 9,2 | 9,5 |

| Formulación | F1 succinato 20 mM trehalosa 230 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,5 | F2 succinato 20 mM sacarosa 28 mM manitol 212 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,5 | F3 citrato 20 mM trehalosa 230 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,0 | F4 citrato 20 mM sacarosa 28 mM manitol 212 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,0 |
|----------------|--|--|--|--|
| 2 meses | 7,4 | 8,1 | 8,3 | 8,8 |
| 3 meses | 9,8 | 9,3 | 9,9 | 9,3 |

Tabla 26: Datos de HIC, área de pico principal (porcentaje) después del almacenamiento a 40 °C

| Formulación | F1 succinato 20 mM trehalosa 230 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,5 | F2 succinato 20 mM sacarosa 28 mM manitol 212 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,5 | F3 citrato 20 mM trehalosa 230 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,0 | F4 citrato 20 mM sacarosa 28 mM manitol 212 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,0 |
|----------------------|--|--|--|--|
| Valor inicial | 87,8 | 87,7 | 87,5 | 87,3 |
| 1 mes | 87,1 | 85,3 | 86,0 | 84,9 |
| 2 meses | 87,1 | 84,1 | 86,6 | 85,3 |
| 3 meses | 83,1 | 79,3 | 83,0 | 81,8 |

Tabla 27: Datos de HIC, área de pico posterior (porcentaje) después del almacenamiento a 40 °C

| Formulación | F1 succinato 20 mM trehalosa 230 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,5 | F2 succinato 20 mM sacarosa 28 mM manitol 212 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,5 | F3 citrato 20 mM trehalosa 230 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,0 | F4 citrato 20 mM sacarosa 28 mM manitol 212 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,0 |
|----------------------|--|--|--|--|
| Valor inicial | 4,7 | 5,0 | 4,2 | 4,3 |
| 1 mes | 5,3 | 6,9 | 4,8 | 5,7 |
| 2 meses | 5,5 | 7,8 | 5,0 | 6,0 |
| 3 meses | 7,1 | 11,4 | 7,1 | 8,9 |

5

Las formulaciones también se caracterizaron por enfoque isoeléctrico e imágenes capilares (ICE). Cada una de las formulaciones mostraba un patrón de tres picos, incluido un pico ácido, un pico principal y un pico básico. Tal como se muestra en la Tabla 28, la Formulación 1 presentaba el menor cambio en el patrón de picos durante tres meses de almacenamiento a 40 °C, mientras que las Formulaciones 2-4 presentaban grandes aumentos en el área del pico básico a lo largo del tiempo.

10

Tabla 28: Datos de ICE después del almacenamiento a 40 °C

| Formulación | Muestra | Área de pico ácido | Área de pico principal | Área de pico básico |
|---|----------------------|--------------------|------------------------|---------------------|
| F1 succinato 20 mM trehalosa 230 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,5 | Valor inicial | 41,8 | 53,0 | 5,2 |
| | 1 mes | 41,4 | 51,5 | 7,1 |
| | 2 meses | 39,9 | 52,5 | 7,6 |
| | 3 meses | 37,0 | 57,1 | 5,9 |
| F2 succinato 20 mM sacarosa 28 mM manitol 212 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,5 | Valor inicial | 40,2 | 55,3 | 4,5 |
| | 1 mes | 44,9 | 48,2 | 6,9 |

| Formulación | Muestra | Área de pico ácido | Área de pico principal | Área de pico básico |
|---|---------------|--------------------|------------------------|---------------------|
| | 2 meses | 48,1 | 44,9 | 7,1 |
| | 3 meses | 40,3 | 50,3 | 9,4 |
| F3 citrato 20 mM trehalosa 230 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,0 | Valor inicial | 39,8 | 56,4 | 3,8 |
| | 1 mes | 36,4 | 56,3 | 7,3 |
| | 2 meses | 37,5 | 53,5 | 9,0 |
| | 3 meses | 35,7 | 55,4 | 9,0 |
| F4 citrato 20 mM sacarosa 28 mM manitol 212 mM 0,02% en peso PS20 pH 6,0 | Valor inicial | 43,0 | 52,5 | 4,5 |
| | 1 mes | 42,1 | 49,0 | 8,9 |
| | 2 meses | 45,3 | 44,9 | 9,8 |
| | 3 meses | 34,5 | 54,7 | 11,9 |

También se examinó la actividad de unión a antígeno del anticuerpo en cada una de las formulaciones. El anticuerpo mantuvo una alta actividad de unión a antígeno durante los tres meses de almacenamiento a 40 °C, independientemente de la formulación.

- 5 Las formulaciones también se ensayaron para determinar la formación de agregados durante la ultrafiltración/diafiltración (procesamiento UF/DF). La formulación 3 presentaba la menor cantidad de formación de agregados, mientras que la formulación 2 presentaba la mayor cantidad; las formulaciones 1 y 4 mostraron cantidades de agregación intermedias (datos no mostrados).

10 Teniendo en cuenta todos los datos de estabilidad acelerada, las formulaciones F1 y F3 muestran una estabilidad superior después de 3 meses de almacenamiento, en comparación con las formulaciones F2 y F4. Esto es un reflejo del hecho de que las formulaciones F2 y F4 (las formulaciones que contienen manitol/sacarosa) muestran una estabilidad relativamente escasa de acuerdo con la detección por turbidez, HP-SEC, partículas microscópicas, HIC e iCE. Al comparar las formulaciones F1 y F3, una diferencia significativa consiste en que F1 tiende a generar ligeramente más agregados que F3 durante el proceso de ultrafiltración/diafiltración. Por lo tanto, F3 se seleccionó como una formulación preferente.

15 Estabilidad de la formulación con respecto a la congelación y descongelación. A continuación se ensayó la formulación F3 para determinar su capacidad para estabilizar el anticuerpo 9E4 humanizado con respecto a la congelación y descongelación. Con este fin, el anticuerpo 9E4 humanizado se purificó y se resuspendió en la formulación F3. Después se introdujeron 20 ml de F3 que contenía 9E4 humanizado en una proporción de 40 mg/ml en bolsas Sartorius Stedim Flexboy de 30 ml, y las bolsas se congelaron a -40 °C. Se realizaron hasta cinco ciclos de congelación/descongelación por bolsa. Las pruebas analíticas del anticuerpo 9E4 humanizado en la formulación F3 se realizaron antes de la congelación y después de 1, 3 y 5 ciclos de congelación/descongelación. Después de hasta tres ciclos de congelación-descongelación no se detectó ningún cambio significativo. Después de cinco ciclos de congelación/descongelación se detectó un ligero aumento en el nivel de anticuerpo agregado (0,2%) y se observaron pequeños cambios en los patrones de HIC e iCE. Todos los otros resultados de ensayo, incluyendo inspección visual del color y las partículas visibles, claridad, exploración por UV, HP-SEC, osmolalidad, pH, recuentos de partículas microscópicas, y actividad de anticuerpo, no cambiaron después de cinco ciclos de congelación-descongelación.

Listado de secuencias

- 30 <110> Garidel, Patrick Langer, Andreas Grundman, Michael
 <120> Formulaciones de anticuerpos y métodos
 <130> 057450/446257
 <150> US 61/843,011
 <151> 04-07-2013
- 35 <150> US 61/979,866
 <151> 15-04-2014

ES 2 704 440 T3

<160> 33

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 1

```

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

```

10 Lys

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Sintetizado

<400> 2

```

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

```

20

<210> 3

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Sintetizado

<400> 3

ES 2 704 440 T3

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

<210> 4

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 4

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

10 <210> 5

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Sintetizado

<400> 5

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

<210> 6

<211> 116

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 704 440 T3

<220>

<223> Sintetizado

<400> 6

```

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

5 <210> 7

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Sintetizado

<400> 7

```

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

<210> 8

<211> 116

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 8

ES 2 704 440 T3

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

<210> 9

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 9

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

10

<210> 10

<211> 116

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 10

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

20 <210> 11

<211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Sintetizado

<400> 11
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 12
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Sintetizado

<400> 12
 Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val
 1 5 10 15
 Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys
 20 25 30
 Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gly Val
 35 40 45
 Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr
 50 55 60
 Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
 65 70 75 80
 Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys
 85 90 95
 Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile
 100 105 110
 Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro
 115 120 125
 Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
 130 135 140

15 <210> 13
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Sintetizado
 <400> 13

ES 2 704 440 T3

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

<210> 14

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 14

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Val Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

10 <210> 15

<211> 339

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 704 440 T3

<220>

<223> Sintetizado

<400> 15

```
gacatccaga tgaccagtc cccctcctcc ctgtccgcct ccgtgggcca ccgctgacc 60
atcacctgca agtccatcca gaccctgctg tactcctcca accagaagaa ctacctggcc 120
tggttccagc agaagcccgg caaggccccc aagctgctga tctactgggc ctccatccgc 180
aagtcgggcg tgcctcccgg cttctccggc tccggctccg gcaccgactt caccctgacc 240
atctcctccc tgcagcccga ggacttcgcc acctactact gccagcagta ctactcctac 300
cccctgacct tcggcggcgg caccaagctg gagatcaag 339
```

5 <210> 16

<211> 339

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Sintetizado

<400> 16

```
gacatccaga tgaccagtc cccctcctcc ctgtccgcct ccgtgggcca ccgctgacc 60
atcacctgca agtccatcca gaccctgctg tactcctcca accagaagaa ctacctggcc 120
tggttccagc agaagcccgg caaggccccc aagctgctga tctactgggc ctccatccgc 180
aagtcgggcg tgcctcccgg cttctccggc tccggctccg gcaccgactt caccctgacc 240
atctcctccc tgcagcccga ggacttcgcc acctactact gccagcagta ctactcctac 300
cccctgacct tcggcggcgg caccaagctg gagatcaag 339
```

<210> 17

<211> 339

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 17

```
gacatccaga tgaccagtc cccctcctcc ctgtccgcct ccgtgggcca ccgctgacc 60
atcacctgca agtccatcca gaccctgctg tactcctcca accagaagaa ctacctggcc 120
tggttccagc agaagcccgg caaggccccc aagctgctga tctactgggc ctccatccgc 180
aagtcgggcg tgcctcccgg cttctccggc tccggctccg gcaccgactt caccctgacc 240
atctcctccc tgcagcccga ggacttcgcc acctactact gccagcagta ctactcctac 300
cccctgacct tcggcggcgg caccaagctg gagatcaag 339
```

20 <210> 18

<211> 348

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Sintetizado

<400> 18

```
gaggtgcagc tgggtggagtc cggcggcggc ctggtgcagc ccggcggctc cctgcgcctg 60
tcctgcgccc cctccggctt cacccttctcc aactacggca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cccggcaagg gcctggagtg ggtggcctcc atctcctccg gcggcggctc cacctactac 180
cccgacaacg tgaagggccc cttcaccatc tcccggagac acgccaagaa ctccctgtac 240
ctgcagatga actccctgcg cgcggaggac accgcccgtgt actactgctc ccgcccgggc 300
gccggcatcg actactgggg ccagggcacc ctggtgaccg tgtcctcc 348
```

30 <210> 19

<211> 348

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

35 <400> 19

ES 2 704 440 T3

gaggtgcagc tggaggagtc aggcggcggc ctggtgcagc cggcgggctc cctgcgcctg 60
 tcctgcgccc cctccggctt caccttctcc aactacggca tgcctgggt gcgccaggcc 120
 cccgcaagg gctggagtg ggtggcctcc atctcctcc gggcgggctc cacctactac 180
 cccgacaacg tgaagggccg cttaccatc tcccgcgaca acgccaagaa ctccctgtac 240
 ctgcagatga actccctgcg cgccgaggac accgccgtgt actactgctc ccgcggcggc 300
 gccggcatcg actactgggg ccagggcacc ctggtgaccg tgcctcc 348

<210> 20
 <211> 348
 <212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 20
 gaggtgcagc tggaggagtc aggcggcggc ctggtgcagc cggcgggctc cctgcgcctg 60
 tcctgcgccc cctccggctt caccttctcc aactacggca tgcctgggt gcgccaggcc 120
 cccgcaagg gctggagtg ggtggcctcc atctcctcc gggcgggctc cacctactac 180
 cccgacaacg tgaagggccg cttaccatc tcccgcgacg acgccaagaa ctccctgtac 240
 ctgcagatga actccctgcg cgccgaggac accgccgtgt actactgctc ccgcggcggc 300
 gccggcatcg actactgggg ccagggcacc ctggtgaccg tgcctcc 348

10 <210> 21
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 15 <223> Sintetizado

<400> 21
 gaggtgcagc tggaggagtc aggcggcggc ctggtgcagc cggcgggctc cctgcgcctg 60
 tcctgcgccc cctccggctt caccttctcc aactacggca tgcctgggt gcgccaggcc 120
 cccgcaagg gctggagtg ggtggcctcc atctcctcc gggcgggctc cacctactac 180
 cccgacaacg tgaagggccg cttaccatc tcccgcgaca acgccaagaa ctccctgtac 240
 ctgcagatga actccctgcg cgccgaggac accgccgtgt actactgctc ccgcggcggc 300
 gccggcatcg actactgggg ccagggcacc ctggtgaccg tgcctcc 348

<210> 22
 <211> 22
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 22
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp
 1 5 10 15
 Val Ser Gly Ser Ser Gly
 20

25 <210> 23
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Sintetizado

<400> 23
 atggacatgc gcgtgcccg ccagctgctg ggctgctga tgctgtgggt gtccggctcc 60
 tccggc 66

35 <210> 24
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 704 440 T3

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 24
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys

5 <210> 25
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 25
 atggaggtcg gcctgtcctg gctgttctcg gtggccatcc tgaagggcgt gcagtcg 57

<210> 26
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 42
 <223> Xaa = Y o F

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 89
 <223> Xaa = F o L

<400> 26
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ile Gln Thr Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Xaa Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 35 40 45
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Lys Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Xaa Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys

30 <210> 27
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 74
 <223> Xaa = N o D

<220>
 <221> VARIANTE

40

ES 2 704 440 T3

<222> 97
 <223> Xaa = A o S

<400> 27
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Xaa Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Xaa Arg Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 28
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 10 <223> Sintetizado

<400> 28
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 29
 <211> 220
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 29

ES 2 704 440 T3

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

<210> 30

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 30

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

<210> 31

<211> 446

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Val Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

5

<210> 32

<211> 446

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 32

ES 2 704 440 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

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

<210> 33

5 <211> 330

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

10 <400> 33

ES 2 704 440 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica que comprende:
- 5 (a) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 29 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 32, con o sin la lisina C-terminal, presente en una concentración de 36 mg/ml a 44 mg/ml;
- (b) tampón de citrato presente en una concentración de aproximadamente 20 mM;
- (c) trehalosa presente en una concentración de aproximadamente 230 mM; y
- (d) polisorbato 20 presente en una concentración de aproximadamente un 0,02% en peso;
- 10 estando **caracterizada** la formulación **por** un pH de aproximadamente 6,0.
2. Una forma liofilizada de la formulación de la reivindicación 1.
3. Una formulación liofilizada de un anticuerpo, que comprende
- 15 (a) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 29 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 32, con o sin la lisina C-terminal;
- (b) citrato;
- (c) trehalosa; y
- (d) polisorbato 20,
- que se puede reconstituir añadiendo agua para obtener una solución acuosa que comprende:
- 20 (a) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 29 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 32, con o sin la lisina C-terminal, y que está presente en una concentración de 36 mg/ml a 44 mg/ml;
- (b) un tampón de citrato presente en una concentración de aproximadamente 20 mM;
- 25 (c) trehalosa presente en una concentración de aproximadamente 230 mM;
- (d) polisorbato 20 presente en una concentración de aproximadamente un 0,02%; y
- (e) un pH de aproximadamente 6,0;
- comprendiendo la formulación liofilizada de forma preferente aproximadamente 200 mg de anticuerpo y permitiendo la misma la reconstitución con agua estéril.
- 30 **4.** La formulación de la reivindicación 1, caracterizada por una osmolalidad de aproximadamente 295 mOsm/kg a aproximadamente 375 mOsm/kg.
- 5.** Una formulación de la reivindicación 1 o 4 para utilizarla en el tratamiento terapéutico o profiláctico de un paciente humano que padece o está en riesgo de padecer una sinucleinopatía; opcionalmente añadiendo la formulación a una bolsa para administración intravenosa a un paciente, o habiéndosele diagnosticado al paciente humano la enfermedad de Parkinson.
- 35 **6.** La formulación liofilizada de la reivindicación 3, que comprende:
- (a) 200 mg del anticuerpo;
- (b) 25 mg de citrato de sodio deshidratado;
- (c) 3,15 mg de ácido cítrico monohidrato;
- 40 (d) 435 mg de trehalosa deshidratada; y
- (e) 1 mg de polisorbato 20, o
- comprendiendo la formulación liofilizada los mismos componentes en las mismas proporciones pero en cantidades diferentes.

7. Un producto farmacéutico que comprende:

(a) un vial que comprende en forma de polvo:

(i) aproximadamente 200 mg de anticuerpo;

(ii) aproximadamente 25 mg de citrato de sodio deshidratado;

5

(iii) aproximadamente 3,15 mg de ácido cítrico monohidrato;

(iv) aproximadamente 435 mg de trehalosa deshidratada; y

(v) aproximadamente 1 mg de polisorbato 20;

(b) instrucciones para la reconstitución del anticuerpo; y

(c) instrucciones para preparar el anticuerpo reconstituido para infusión, en donde:

10

(i) el anticuerpo comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 29 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 32 con o sin la lisina C-terminal; y

(ii) las instrucciones de reconstitución requieren reconstitución inicial con agua hasta un volumen extraíble de aproximadamente 5 ml.

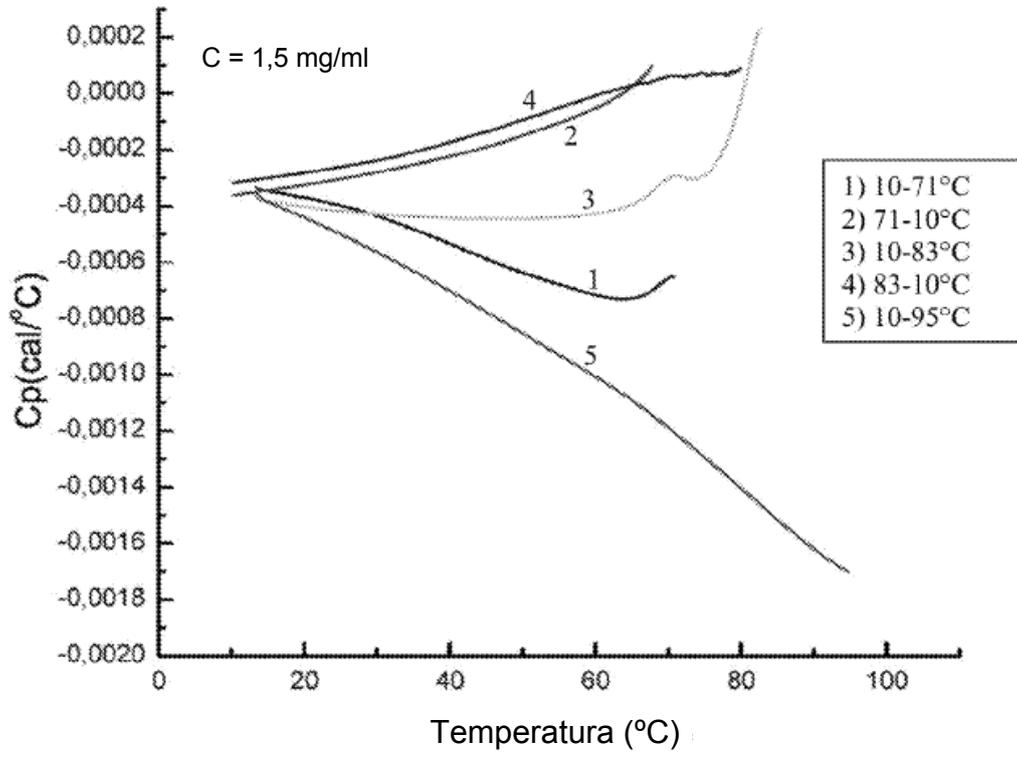


FIGURA 1

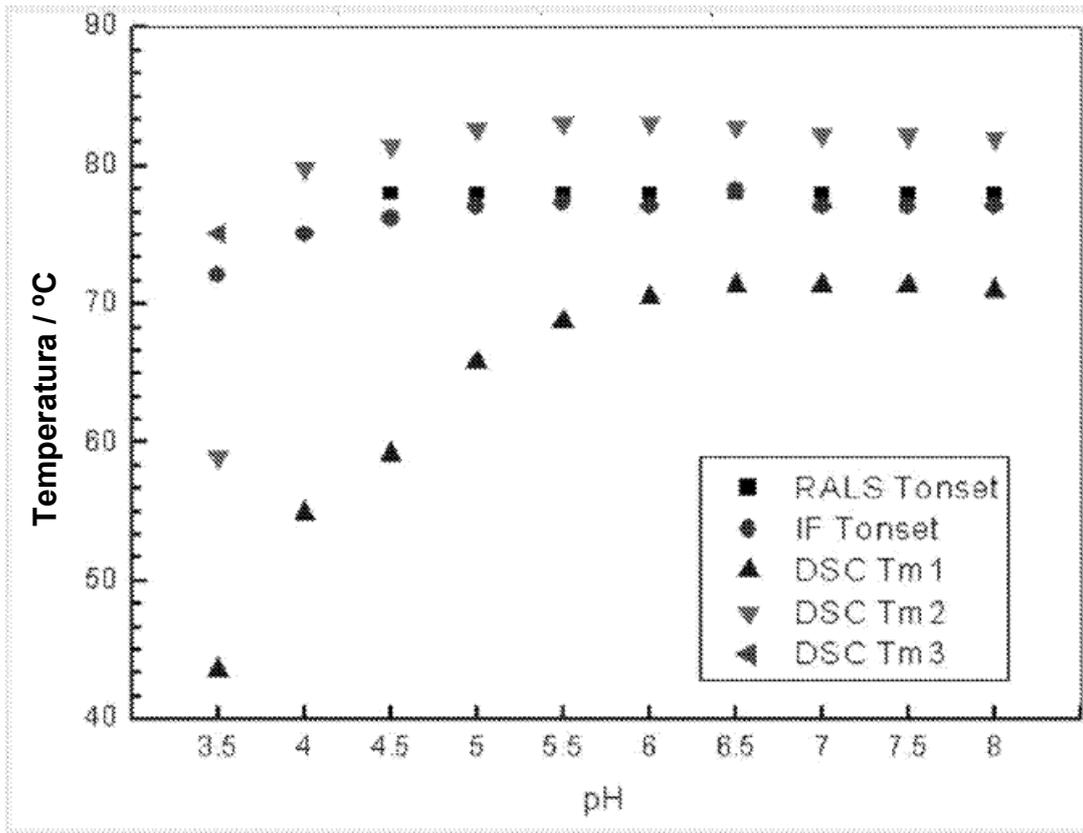


FIGURA 2

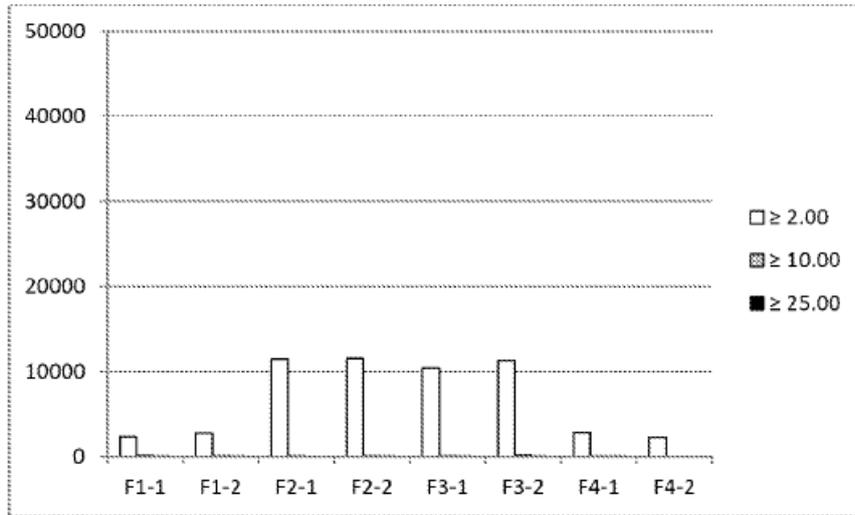


FIGURA 3

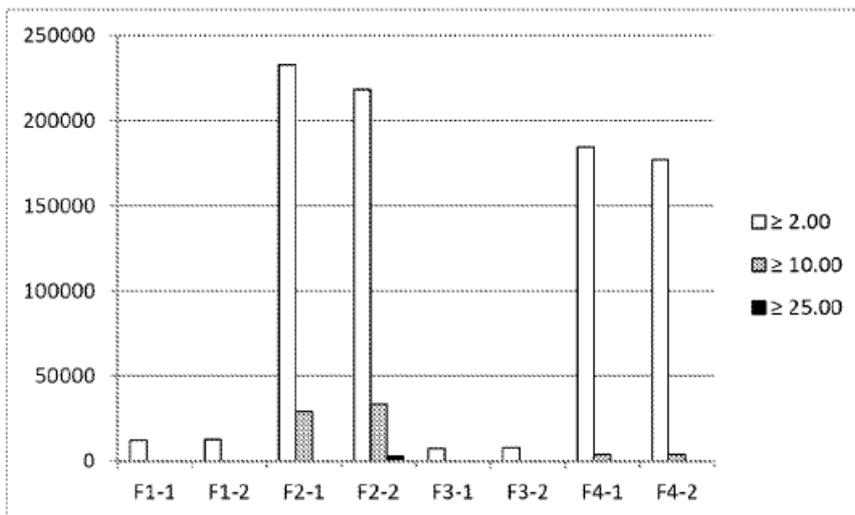


FIGURA 4

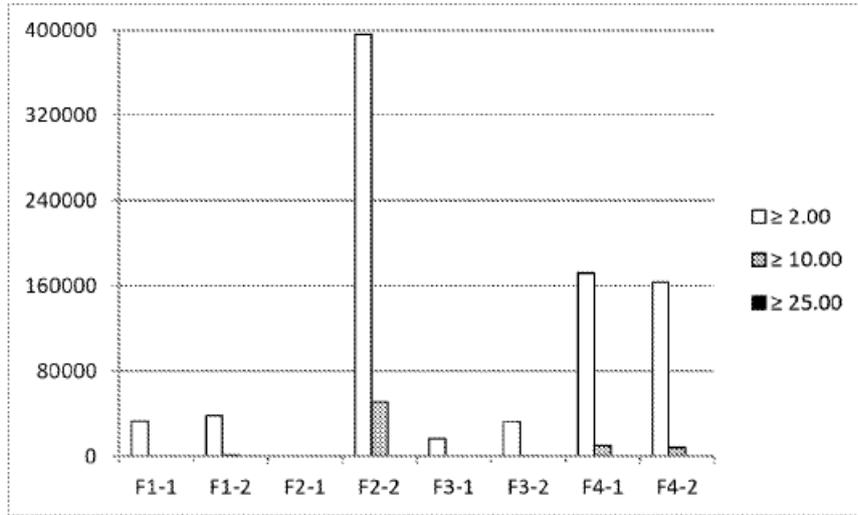


FIGURA 5

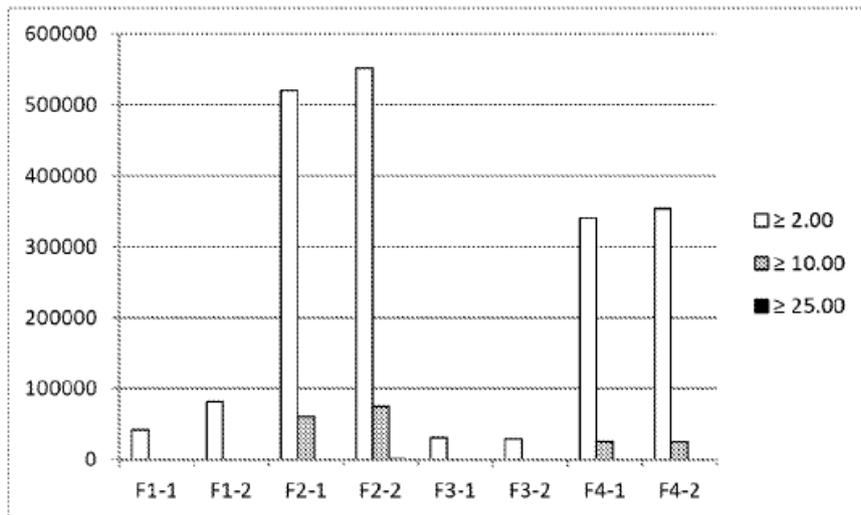


FIGURA 6

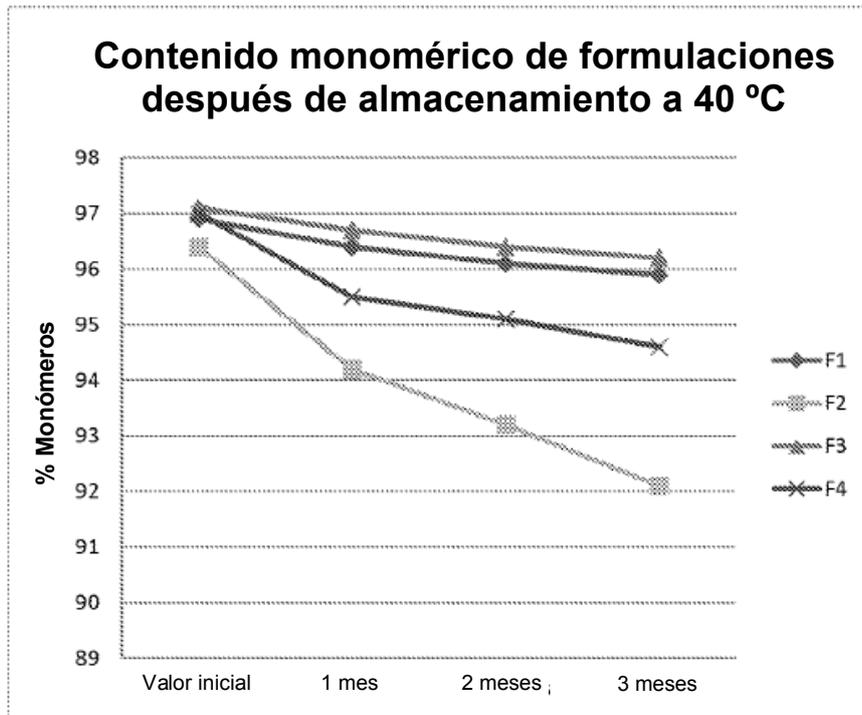


FIGURA 7