

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 794 449**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2013 PCT/EP2013/072761**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14068026**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2013 E 13798590 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 2914290**

54 Título: **Formulación líquida que comprende un compuesto neutralizante del GM-CSF**

30 Prioridad:

31.10.2012 US 201261720892 P
21.12.2012 EP 12199191

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.11.2020

73 Titular/es:

AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH (50.0%)
Staffelseestrasse 2
81477 München, DE y
TAKEDA GMBH (50.0%)

72 Inventor/es:

URBIG, THOMAS;
BOEHM, THOMAS;
STEINHILBER, WOLFRAM y
MOLHOJ, MICHAEL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 794 449 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

Formulación líquida que comprende un compuesto neutralizante del GM-CSF

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a formulaciones líquidas estables que comprenden un compuesto neutralizante del factor estimulante de colonia de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Los ingredientes de las formulaciones preferiblemente proporcionan estabilidad durante ciclos repetidos de congelación-descongelación a largo plazo. En un aspecto preferido, las formulaciones son para su uso en terapias, preferiblemente para su uso en el tratamiento de trastornos inflamatorios y autoinmunes, preferiblemente incluyendo trastornos alérgicos y psoriásicos, así como enfermedades artríticas o asmáticas. Además, se proporciona un kit que comprende las formulaciones de la invención.

10 Las proteínas se utilizan en una amplia gama de aplicaciones en los campos de los productos farmacéuticos, productos veterinarios, cosméticos y otros productos de consumo, alimentos, piensos, diagnóstico, química industrial y descontaminación. En ocasiones, dichos usos se han visto limitados por restricciones inherentes a las proteínas mismas o impuestas por el entorno o los medios en los que se utilizaban. Dichas restricciones pueden dar como resultado una pobre estabilidad de las proteínas, variabilidad del rendimiento o unos altos costes. Debido al advenimiento de la biotecnología, es posible producir una amplia variedad de proteínas para aplicaciones terapéuticas. Después de su producción, los productos farmacéuticos proteicos generalmente se almacenan antes de su uso. Debido al hecho de que las proteínas son generalmente más grandes y más complejas que los productos farmacéuticos "tradicionales", la formulación y el procesamiento de productos farmacéuticos de proteínas que son adecuados para el almacenamiento pueden ser particularmente prometedores. Para consultar revisiones de formulaciones farmacéuticas de proteínas y diseño de procesos, véase Carpenter et al. (1997), Pharm. Res. 14: 969-975; Wang (2000), Int. J. Pharmaceutics 203: 1-60; y Tang y Pikal (2004), Pharm. Res. 21: 191-200.

15 Se pueden considerar varios factores al diseñar formulaciones y procedimientos para la producción farmacéutica de proteínas. La principal preocupación es la estabilidad de las proteínas a través de cualquiera o de todas las etapas de fabricación, envío y manejo, que pueden incluir la preparación de la composición, congelación, liofilización, secado, almacenamiento, envío, reconstitución, ciclos de congelación / descongelación y almacenamiento posterior a la reconstitución por parte del usuario final. Otras posibles consideraciones incluyen la facilidad y la economía de fabricación, manipulación y distribución; la composición del producto final para su administración al paciente; y la facilidad de su uso por parte del usuario final, incluida la solubilidad de la formulación liofilizada tras la reconstitución.

20 Las formulaciones líquidas pueden satisfacer ciertos objetivos. Las posibles ventajas de las formulaciones líquidas incluyen su facilidad de fabricación y economía y la adecuación de las mismas para el usuario final. Con frecuencia, cuando se almacenan durante períodos prolongados, los polipéptidos son inestables en solución (Manning et al (1989), Pharm. Res. 6:903-918). Como consecuencia, se han desarrollado otras etapas de procesamiento para permitir una vida útil más larga, incluido el secado, p. ej., mediante liofilización. Las formulaciones liofilizadas también pueden proporcionar ciertas ventajas. Los beneficios potenciales de la liofilización incluyen una mayor estabilidad de la proteína, así como la facilidad y economía en los envíos y almacenamientos. Sin embargo, las composiciones farmacéuticas liofilizadas pueden ser menos convenientes para el usuario final.

25 Además de la elección de la forma básica de la composición (por ejemplo, liofilizada, líquida, congelada, etc.), la optimización de una formulación de proteínas generalmente implica variar los componentes de la formulación y sus concentraciones respectivas para maximizar la estabilidad de la proteína. Una variedad de factores puede afectar a la estabilidad de la proteína, incluyendo la fuerza iónica, el pH, la temperatura, los ciclos de congelación / descongelación, las fuerzas de cizallamiento, la congelación, la liofilización, el secado, la agitación y la reconstitución. La inestabilidad de las proteínas puede estar causada por la degradación física (por ejemplo, desnaturalización, agregación o precipitación) o la degradación química (por ejemplo, desamidación, oxidación o hidrólisis). La optimización de los componentes y las concentraciones de la formulación se basa únicamente en estudios empíricos y / o enfoques racionales para superar las fuentes de inestabilidad.

30 A veces, en un almacenamiento a largo plazo de composiciones farmacéuticas que contienen polipéptidos, incluidas formulaciones acuosas y liofilizadas, los polipéptidos activos pueden perderse debido a la agregación y / o la degradación.

35 Por consiguiente, pueden abordarse prácticas típicas para mejorar la estabilidad del polipéptido variando la concentración de elementos de la formulación, o agregando excipientes para modificar la formulación (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.580.856 y 6.171.586 y solicitudes de Patentes de los Estados Unidos Nos. US 2003/0202972, US 2003/0180287). El documento US 5.580.856 es una patente prototipo que describe agentes, tales como polímeros naturales, tensioactivos, polisacáridos sulfatados, proteínas y tampones que puede añadirse para estabilizar a una proteína seca durante o después de la deshidratación. Sin embargo, aparte de muchas opciones, la patente de los Estados Unidos 5.580.856 no enseña qué estabilizador debe agregarse a qué proteína. En consecuencia, mientras el lector experto se da cuenta de que hay muchas opciones, él o ella tendría que encontrar para su proteína las mejores condiciones entre las muchas opciones descritas por el documento US

5.580.856. La solicitud de patente estadounidense 2003/0202972 describe una formulación liofilizada estable de un anticuerpo anti-Her2, en el que el estabilizador es azúcar, trehalosa o un tampón. Sin embargo, aunque estos estabilizadores pueden ser útiles para un anticuerpo, no pueden extrapolarse a otras proteínas. La solicitud de patente estadounidense 2003/0180287 es similar a la US 2003/0202972 en la que también se describe una solución estable de una proteína de tipo inmunoglobulina, es decir, una proteína que contiene un dominio Fc. El estabilizador puede ser fosfato de sodio, fosfato de potasio, citrato de sodio o potasio, ácido maleico, acetato de amonio, tampón tris, acetato, dietanolamina, histidina, lisina o cisteína. Entre estos estabilizadores químicamente distintos que podrían ser elegidos por el lector experto, la lisina resultó ser adecuada. Sin embargo, como con el documento US 2003/0202972, el estabilizador específico es simplemente adecuado para una proteína específica, aquí un dominio Fc que contiene la proteína, y no puede ser extrapolado per se a otra proteína. En consecuencia, el uso de aditivos no se puede extrapolar de una proteína específica a otra proteína no relacionada. De hecho, el uso de aditivos, al tiempo que mejora el almacenamiento, aún puede dar como resultado polipéptidos inactivos. Además, en el caso de la liofilización, la etapa de rehidratación puede introducir condiciones que resultan en la inactivación del polipéptido mediante, por ejemplo, la agregación o desnaturalización (Hora et al. (1992), Pharm Res., 9: 33-36; Liu et al. (1991) Biotechnol. Bioeng., 37: 177-184). De hecho, la agregación de polipéptidos no es deseable ya que puede dar lugar a la inmunogenicidad (Cleland et al. (1993) Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems, 10: 307-377; y Robbins et al. (1987), Diabetes, 36: 838-845).

El mantenimiento de la actividad biológica durante el desarrollo y la fabricación de productos farmacéuticos depende de la estabilidad inherente de la macromolécula, así como de las técnicas de estabilización empleadas. Existe una gama de técnicas de estabilización de proteínas; incluyendo la adición de "estabilizadores" químicos a la solución o suspensión acuosa de la proteína. Por ejemplo, la patente de los Estados Unidos 4.297.344 describe la estabilización de los factores de coagulación II y VIII, antitrombina III y plasminógeno contra el calor mediante la adición de aminoácidos seleccionados. La patente de los Estados Unidos 4.783.441 describe un método para estabilizar proteínas mediante la adición de sustancias tensioactivas. La patente de los Estados Unidos 4.812.557 describe un método para estabilizar la interleucina-2 usando albúmina de suero humano. Los métodos de congelación / descongelación en los que la preparación se mezcla con un crioprotector y se almacena a temperaturas muy bajas es otra opción para estabilizar una proteína. Sin embargo, no todas las proteínas sobrevivirán a un ciclo de congelación / descongelación. El almacenamiento en frío con un aditivo crioprotector, normalmente el glicerol, es otra opción. El almacenamiento en forma de vidrio, como se describe en la patente de los Estados Unidos 5.098.893 también podría hacerse. En este caso, las proteínas se disuelven en sustancias solubles o hinchables en agua que están en estado amorfo o vítreo. El método más ampliamente utilizado para la estabilización de proteínas es la liofilización. Siempre que no se pueda lograr suficiente estabilidad de la proteína en solución acuosa, la liofilización proporciona la alternativa más viable. Una desventaja de la liofilización es que requiere un procesamiento sofisticado, es lento y costoso. Además, si la liofilización no se lleva a cabo con cuidado, la mayoría de las preparaciones se desnaturalizan al menos parcialmente mediante los etapas de congelación y deshidratación de la técnica. El resultado es con frecuencia la agregación irreversible de una porción de moléculas de proteínas, lo que hace que una formulación sea inaceptable para la administración parenteral.

En términos generales, la degradación de las proteínas ha sido bien descrita en la literatura, pero el almacenamiento y la solubilidad de los compuestos neutralizan el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (más conocido como GM-CSF), en particular de polipéptidos y anticuerpos anti-GM-CSF, no se ha descrito.

Además, aunque se sabía en la técnica que había una multitud de opciones para agentes estabilizadores de proteínas, así como para agentes que permiten una alta concentración de una proteína mientras se mantienen estables, hasta la presente invención, no se reconoció en la técnica de que una formulación que comprende compuestos neutralizantes de GM-CSF en altas concentraciones podría ser inestable y, por lo tanto, requerir mejoras.

En la preparación de una composición farmacéutica que comprende una proteína, como un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, es un objetivo desarrollar formulaciones líquidas de alta concentración debido al potencial de administración subcutánea que resulta en una mayor conveniencia para el paciente. Sin embargo, existe un consenso general de que el desarrollo de formulaciones de anticuerpos de alta concentración, en particular los anticuerpos monoclonales, plantea serios desafíos con respecto a la estabilidad física y química de los anticuerpos monoclonales, tal y como una mayor formación de agregados solubles e insolubles que mejoran la probabilidad de una respuesta inmunogénica, así como dar lugar a una baja bioactividad.

La formación de agregados por un polipéptido durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar negativamente a la actividad biológica de ese polipéptido, dando como resultado la pérdida de la eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados puede causar otros desafíos, como el bloqueo de los tubos, las membranas o las bombas cuando la composición farmacéutica que contiene el polipéptido se administra utilizando un sistema de infusión. Además, se ha informado que las formulaciones de anticuerpos a alta concentración dan como resultado un aumento de la viscosidad, creando así serios desafíos para la capacidad de fabricación y la facilidad de inyección. Las formulaciones altamente viscosas son difíciles de fabricar, extraer en una jeringa e inyectar. El uso de la fuerza en la manipulación de las formulaciones viscosas conduce a una formación excesiva de espuma, lo que puede conducir a la desnaturalización e inactivación de los anticuerpos monoclonales activos.

Por lo tanto, existe una gran necesidad de conseguir una composición farmacéutica estable de proteína altamente concentrada que comprenda un compuesto que neutralice GM-CSF, p. ej., un anticuerpo y que tenga una viscosidad baja y factible adecuada para una administración subcutánea, tal como en un dispositivo listo para usar. Además, desde el punto de vista del paciente, sería altamente deseable disponer de productos estables a temperatura ambiente. En este momento, en particular, no hay formulaciones de anticuerpos comercializadas en las que el almacenamiento a temperatura ambiente sea posible a lo largo de la vida útil del producto farmacológico. Típicamente, se produce un aumento de la agregación de proteínas que causa un nivel inaceptablemente alto de agregados e impurezas relacionadas con las proteínas, lo que puede dar lugar a reacciones inmunogénicas. Muchos de los productos de anticuerpos monoclonales comercializados contienen tensioactivos en su formulación. Típicamente, se añaden tensioactivos para reducir el estrés interfacial que puede inducir la agregación de proteínas y la formación de partículas que conducen a una calidad inaceptable del producto. Ejemplos de estrés interfacial podría ser el contacto de la proteína con i) aire ii) material de cierre del recipiente, tal y como un émbolo de goma, pistón, vidrio, jeringas precargadas iii) materiales relacionados con la producción, como tanques de acero, tubos y bombas iv) hielo, durante la congelación / descongelación, etc. Sin embargo, los tensioactivos, como los polisorbatos, generalmente contienen un residuo de peróxidos que pueden oxidar la molécula de proteína, lo que puede comprometer la calidad del producto. Además, desde el punto de vista de la fabricación, la adición de polisorbatos requiere de una etapa adicional en la producción ya que la ultra / diafiltración es difícil de realizar cuando la formulación contiene dichos polisorbatos. La prevención de la formación de productos oxidados es un problema difícil, por lo tanto, se requiere un manejo cuidadoso de los polisorbatos para controlar la formación de productos oxidados. Por lo tanto, también sería deseable diseñar formulaciones sin tensioactivos, tanto desde el punto de vista de la estabilidad como de la fabricación.

Recientemente se ha demostrado que el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), inicialmente como factor de crecimiento hematopoyético, es una citocina importante en la inflamación y la autoinmunidad. Los niveles elevados de ARNm o proteína GM-CSF se miden en una variedad de sitios inflamatorios, incluso en pacientes alérgicos y psoriásicos, pacientes artríticos y asmáticos. Numerosos estudios in vivo han demostrado en los últimos años que el bloqueo de GM-CSF a través de anticuerpos neutralizantes puede prevenir o incluso curar enfermedades proinflamatorias en varios modelos de inflamación, incluidos modelos para encefalitis autoinmune experimental de la artritis, psoriasis y enfermedad pulmonar. Por lo tanto, es altamente deseable tener disponible una formulación con un compuesto neutralizador de GM-CSF que sea, en particular, estable, que contenga altas cantidades de un compuesto neutralizador de GM-CSF y / o pueda administrarse por vía subcutánea.

Por lo tanto, el desafío técnico de la presente invención es cumplir con las necesidades descritas anteriormente.

La presente invención aborda estas necesidades y, por lo tanto, proporciona una solución al desafío técnico de las realizaciones relativas a las formulaciones, así como a los métodos y usos que aplican estas formulaciones en el tratamiento de sujetos que padecen enfermedades que se beneficiarían de la administración de compuestos neutralizantes de GM-CSF. Estas realizaciones se caracterizan y describen en este documento, se ilustran en los Ejemplos y se reflejan en las reivindicaciones.

Debe notarse que, como se usa en este documento, las formas singulares "una/uno", "un" y "la/el" incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo" incluye uno o más de tales anticuerpos diferentes y la referencia a "el método" incluye la referencia a etapas equivalentes y métodos conocidos por los expertos en la técnica que podrían modificarse o sustituirse por los métodos descritos en este documento.

A menos que se indique lo contrario, la expresión "al menos" que precede a una serie de elementos debe entenderse que se refiere a cada elemento de la serie. Los expertos en la materia reconocerán, o podrán determinar utilizando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en este documento. Dichos equivalentes están destinados a ser abarcados por la presente invención.

A lo largo de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprender" y sus variaciones, tales como "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de número enteros establecido o etapas, pero no la exclusión de ningún otro número entero, o etapa o grupo de números enteros o etapas. Cuando se usa en el presente documento, la expresión "que comprende" ésta puede sustituirse por la expresión "que contiene" o, a veces, cuando se usa en el presente documento con la expresión "que tiene" o ésta puede incluso sustituirse por la expresión "que consiste en".

Cuando se usa en el presente documento "que consiste en" se excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en el elemento de la reivindicación. Cuando se usa en el presente documento, "que consiste esencialmente en" no excluye materiales ni etapas que no afecten materialmente a las características básicas y novedosas de la reivindicación. En cada caso en el presente documento, cualquiera de las expresiones "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" pueden reemplazarse por cualquiera de los otros dos términos.

Como se usa en el presente documento, se entiende que el término conjuntivo "y / o" entre los múltiples elementos citados abarca tanto opciones individuales como combinadas. Por ejemplo, cuando dos elementos están unidos por "y / o", una primera opción se refiere a la capacidad de aplicación del primer elemento sin el segundo. Una segunda opción se refiere a la capacidad de aplicación del segundo elemento sin el primero. Una tercera opción se refiere a la capacidad de aplicación de los elementos primero y segundo juntos. Se entiende que cualquiera de estas opciones se encuentra dentro del significado y, por lo tanto, satisface el requisito del término "y / o" como se usa en este documento. La capacidad de aplicación concurrente de más de una de las opciones también se entiende dentro del significado y, por lo tanto, satisface el requisito del término "y / o", como se usa en este documento.

A continuación se describen diversos aspectos y realizaciones de la invención.

10 La presente invención se refiere a una composición acuosa que comprende:

i) un compuesto neutralizante de GM-CSF que es un anticuerpo monoclonal humano

1. Una composición acuosa que comprende:

15 i) un compuesto neutralizante de GM-CSF, que es un anticuerpo monoclonal humano que se une a GM-CSF que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera como se establece en SEQ ID NO. 34 y una secuencia de aminoácidos de cadena pesada como se establece en SEQ ID NO: 35, a una concentración de 100 mg / ml a 180 mg / ml,

ii) 5% (p/v) de sorbitol,

iii) L-histidina 30 mM y

iv) tiene un pH de 5,8.

20 Además, la presente invención se refiere a la composición anterior que está libre de tensioactivos o aminoácidos adicionales.

La presente invención también se refiere a la composición mencionada anteriormente, que comprende 150 mg / ml del anticuerpo o su fragmento funcional que se une al GM-CSF.

25 Además, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente que es estable durante al menos 24 meses a aproximadamente 2-8°C o al menos 28 días a temperatura ambiente.

La composición mencionada anteriormente puede ser para uso en terapia.

Además, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente para su administración intravenosa y / o subcutánea.

La composición de la invención puede usarse en el tratamiento de trastornos inflamatorios y autoinmunes.

30 Estos trastornos se seleccionan entre trastornos alérgicos, psoriásicos, artríticos y asmáticos.

Además, se describe un kit que comprende la composición descrita anteriormente.

35 Con el objetivo en mente de proporcionar una formulación que tenga una alta concentración de compuestos neutralizantes de GM-CSF, los presentes inventores reconocieron que los compuestos que neutralizan GM-CSF pueden ser inestables a altas concentraciones y también pueden ser inestables durante un período prolongado de almacenamiento.

40 De hecho, hay muchas formas en las que los compuestos neutralizantes de GM-CSF, como las proteínas, pueden ser inestables. Por ejemplo, la inestabilidad de las proteínas podría estar causada por la agregación o desagregación de proteínas, pero también por la inestabilidad química debido a la desaminación, desamidación, oxidación, ruptura y formación de enlaces disulfuro, hidrólisis, succinimidación, reticulación no de disulfuro, desglicosilación o "pardeamiento enzimático" (reacción de Maillard) o cualquier combinación de estos fenómenos; véase, por ejemplo, Wang et al. (1999), En Int. J. Pharm. 185: 129-188). Además, parámetros fisicoquímicos como la temperatura, el valor del pH, la adsorción en superficies, sales, iones metálicos, agentes quelantes, fuerzas físicas tales como las fuerzas de corte, desnaturalizantes de proteínas, solventes no acuosos, concentración de proteínas, fuente y pureza de la proteína, morfismo de proteínas o la presión, pueden influir en la estabilidad de las proteínas.

45 Sin embargo, hay muchos factores que pueden influir en la estabilidad de las proteínas, podrían tomarse muchas medidas para estabilizar una proteína. Por ejemplo, una proteína puede estabilizarse internamente (cambiando aminoácidos) o externamente. La estabilización externa podría lograrse mediante agentes quelantes, iones metálicos, agentes reductores, polímeros, polietilenglicoles / polioles, albúmina sérica, tensioactivos, azúcares y polioles, ácidos grasos y fosfolípidos, aminoácidos, tampones, etc.; véase, por ejemplo, Wang, Y, y Hanson M (1988), J. Parental Sci. & Technology, 42, Suplemento: 4-26; Wang et al. (1999), En Int. J. Pharm. 185: 129-188. En

resumen, para estabilizar los compuestos neutralizantes de GM-CSF, tales como anticuerpos en una formulación, los expertos habrían tenido muchas opciones disponibles.

En el presente caso, los inventores observaron que los compuestos neutralizantes de GM-CSF pueden mostrar agregación y/o pueden no disolverse a altas concentraciones. Muchos factores diferentes pueden causar la agregación de una proteína en una formulación. Los procedimientos típicos de purificación y almacenamiento pueden exponer las formulaciones de proteínas a condiciones y componentes que hacen que la proteína se agregue. Por ejemplo, las proteínas en una formulación pueden agregarse como resultado de uno o más de los siguientes: almacenamiento, exposición a temperaturas elevadas, el pH de la formulación, la fuerza iónica de la formulación y la presencia de ciertos tensioactivos (p. ej., polisorbato-20 y polisorbato-80) y agentes emulsionantes. Del mismo modo, las proteínas pueden agregarse cuando se exponen al esfuerzo cortante, como reconstituir una torta de proteína liofilizada en solución, purificar por filtración una muestra de proteínas, congelar-descongelar, agitar o transferir una solución de proteína mediante una jeringa. La agregación también puede ocurrir como resultado de interacciones de moléculas de polipéptidos en solución y en las interfaces líquido-aire dentro de viales de almacenamiento. Se pueden producir cambios conformacionales en los polipéptidos adsorbidos en las interfaces aire-líquido y sólido-líquido durante la compresión o extensión de las interfaces como resultado de la agitación durante el transporte. Tal agitación puede hacer que la proteína de una formulación se agregue y finalmente precipite con otras proteínas adsorbidas.

Además, la exposición de una formulación de proteína a la luz puede hacer que la proteína se agregue. La presente invención proporciona así formulaciones que permiten altas concentraciones de compuestos neutralizantes de GM-CSF y que reducen la agregación de estos compuestos. Sin estar limitado a ninguna teoría, la reducción de la agregación se cree que se logra controlando uno o más de los mecanismos de agregación mencionados anteriormente. Esto puede dar como resultado, por ejemplo, una mejor estabilidad del producto y una mayor flexibilidad en los procesos de fabricación y las condiciones de almacenamiento.

Los presentes inventores tenían como objetivo proporcionar una formulación con una alta concentración de compuestos neutralizantes de GM-CSF, con el fin de, por ejemplo, permitir un menor volumen de inyección que fuera adecuado para reducir los efectos secundarios como el dolor debido a un volumen grande de inyección o permitir la administración subcutánea con un pequeño volumen.

Siendo así, los presentes inventores han observado durante sus estudios una cierta inestabilidad de los compuestos que neutralizan el GM-CSF y, por lo tanto, tenían como objetivo mejorar esta observación no deseada. En consecuencia, su objetivo fue concentrar los compuestos neutralizantes de GM-CSF manteniéndolos en solución, es decir, en una etapa disuelta. Al hacerlo así, dispusieron de una multitud de opciones y alternativas disponibles, sin embargo, sin ninguna indicación de que alguna de ellas fuera adecuada para resolver el problema objetivo.

"Etapa disuelta" significa que el compuesto neutralizante de GM-CSF, preferiblemente en una concentración de al menos aproximadamente 20 mg/ml, está en solución, es decir, disuelto y/o disperso directamente en la solución acuosa (es decir, en la fase acuosa) de la formulación. Preferiblemente, el compuesto neutralizante de GM-CSF se disuelve o dispersa homogéneamente. Homogéneamente significa que el compuesto neutralizante de GM-CSF que se disuelve y/o dispersa en la formulación acuosa es casi uniforme, preferiblemente está distribuido uniformemente en la formulación acuosa de modo que la concentración ("c") del compuesto neutralizante de GM-CSF ("n" en caso de masa molar o "m" en caso de masa) sea casi idéntica, preferiblemente idéntica en el volumen ("v") (o en todo el volumen) de la solución acuosa, es decir, $c=n/v$ o $c=m/v$, respectivamente, sea casi constante, preferiblemente constante. Preferiblemente no hay gradiente de concentración dentro de la formulación.

En consecuencia, una formulación estable de la presente invención que comprenda un compuesto neutralizante de GM-CSF puede considerarse preferiblemente como una solución acuosa, en la que el compuesto neutralizante de GM-CSF se disuelve directamente y/o se dispersa en ella.

Una "solución" es una mezcla homogénea de dos o más sustancias/componentes. En tal mezcla, un soluto (en la presente invención un compuesto neutralizante de GM-CSF) se disuelve (como se describió anteriormente) en otra sustancia (en la presente invención preferiblemente una formulación acuosa), también conocida como disolvente.

Dado lo anterior, el compuesto neutralizante de GM-CSF no se disuelve y/o dispersa en la solución acuosa de forma preferible. La expresión "estado disuelto" también incluye que el compuesto neutralizante de GM-CSF está esencial y preferiblemente no emulsionado o, más preferiblemente, no emulsionado en absoluto en la solución acuosa.

Además, la expresión "estado disuelto" incluye que el compuesto neutralizante de GM-CSF no esté esencialmente encapsulado y/o atrapado (preferiblemente menos del 2%, 1% o 0,5% del compuesto neutralizante de GM-CSF puede ser encapsulado y/o atrapado o, más preferiblemente, no encapsulado y/o atrapado en absoluto, por ejemplo, en liposomas, liposomas multilaminares o similares).

También está comprendida en la presente descripción una formulación líquida que contiene un compuesto neutralizante de GM-CSF estable y que no sufre la formación de conjugados/agregados o fragmentos/productos de degradación cuando se almacena durante un largo período, y cuya formulación es adecuada para la administración subcutánea.

Específicamente, después de probar muchos agentes estabilizadores diferentes, los presentes inventores encontraron que los compuestos neutralizantes de GM-CSF podrían estabilizarse si se añadiera un modificador de la tonicidad a la solución que se va a almacenar. Algunos ejemplos de modificadores de la tonicidad incluyen, entre otros, azúcares y alcoholes de azúcar. Los azúcares simples se llaman monosacáridos e incluyen glucosa, fructosa, galactosa, xilosa, ribosa, rona, lactulosa, alosa, altrosa, gulosa, idosa, talosa, arabinosa y lixosa. También están comprendidos los disacáridos que incluyen, por ejemplo, sacarosa, maltosa, lactosa, isomaltosa, trehalosa y celubiosa. Los alcoholes de azúcar incluyen sorbitol, manitol, glicerina, eritritol, maltitol, xilitol, poliglicitol. El azúcar puede no ser un azúcar no reductor como la sacarosa o la trehalosa. Los azúcares no reductores se caracterizan por la ausencia de una estructura de cadena abierta, por lo que no son susceptibles a las reacciones de oxidación-reducción. Por lo tanto, uno o más de los azúcares no reductores, como la sacarosa o la trehalosa, o uno o más de los alcoholes de azúcar, como el manitol o el sorbitol podrían añadirse a la formulación que comprende el compuesto neutralizante de GM-CSF. También se podrían añadir combinaciones de azúcares no reductores y alcoholes de azúcar a la solución, como la sacarosa y el manitol, sacarosa y sorbitol, trehalosa y manitol, o trehalosa y sorbitol. Más preferiblemente se añaden los alcoholes de azúcar manitol y/o sorbitol, preferiblemente en su forma D, más preferiblemente se añade sorbitol a la solución. La concentración del modificador de la tonicidad, preferiblemente sorbitol, está entre aproximadamente 1% y aproximadamente 15% (p/v), preferiblemente entre aproximadamente un 2% y aproximadamente un 10% (p/v), más preferiblemente entre aproximadamente un 3% y aproximadamente un 7% (p/v), más preferiblemente entre aproximadamente un 4% y aproximadamente un 6% (p/v) y más preferiblemente aproximadamente un 5% (p/v).

Otra sustancia específicamente preferida para estabilizar los compuestos neutralizantes de GM-CSF a alta concentración con respecto al almacenamiento a largo plazo es un sistema tampón con un pH de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 10, preferiblemente entre aproximadamente 4 y aproximadamente 7, más preferiblemente entre aproximadamente 4 y aproximadamente 6 o entre aproximadamente 5 y aproximadamente 7, incluso más preferiblemente entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5 y, más preferiblemente, con un pH de aproximadamente 5,8. El tampón de la invención es un tampón de histidina. Cuando se refiere a esto, se entiende que un aminoácido es un L-aminoácido o D-aminoácido, donde se prefiere L-amino. Específicamente, se utiliza histidina o una sal de la misma para el sistema de tampón. Preferiblemente la sal es un cloruro, fosfato, acetato o sulfato, más preferiblemente la sal es un cloruro. El pH del sistema tampón de histidina está entre 5 y aproximadamente 7, preferiblemente entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5, más preferido es el pH aproximadamente, o exactamente igual a 5,8. El pH puede ajustarse mediante el uso de bases y ácidos de uso convencional, preferiblemente NaOH. La concentración del sistema tampón, específicamente el sistema tampón de histidina, está entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM, preferiblemente entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 40 mM, más preferiblemente aproximadamente 30 mM. La concentración del tampón de histidina de la presente invención es 30 mM.

Se utiliza la combinación del sistema tampón, específicamente el tampón de histidina, y el modificador de tonicidad, específicamente el sorbitol, para estabilizar los compuestos neutralizantes de GM-CSF en la solución, con el fin de evitar la agregación y hacer que la formulación sea lo suficientemente estable para el almacenamiento a largo plazo y/o durante uno o más ciclos de congelación/deformación. Se demostró que es preferible en términos de estabilidad tener aproximadamente 1 6% (p/v) y superior de alcohol de azúcar, preferiblemente sorbitol, en la formulación. Sin embargo, el límite superior para la osmolalidad de la formulación está configurado para ser de aproximadamente 470 mOsm/kg que sigue siendo hiperosmótico pero similar a la osmolalidad de un producto aprobado (Synagis; Lm. Administración). Por lo tanto, se tuvo que encontrar un compromiso entre la estabilidad óptima, la tonicidad y la concentración del compuesto neutralizante de GM-CSF tal como se describe en los ejemplos de la presente invención. Por lo tanto, una concentración preferente de alcohol de azúcar, preferiblemente sorbitol, está entre aproximadamente el 3% y aproximadamente el 7% (p/v), más preferiblemente entre aproximadamente un 4% y aproximadamente un 6% (p/v) y, más preferiblemente, aproximadamente un 5% (p/v).

En algunas realizaciones de la presente invención, las formulaciones o composiciones de la invención que comprenden un compuesto neutralizante de GM-CSF no requieren más excipientes además de los divulgados anteriormente (es decir, un tampón y un modificador de la tonicidad), como, por ejemplo, tensioactivos y aminoácidos, que se utilizan en formulaciones tradicionales para estabilizar proteínas en solución. Además, las formulaciones descritas en este documento son preferidas respecto a las formulaciones estándar porque tienen una menor inmunogenicidad debido a la falta de agentes adicionales comúnmente necesarios para la estabilización de proteínas.

Se sabe que los aminoácidos son útiles para estabilizar las proteínas a una alta concentración, entre otras cosas, mediando la solubilidad de proteínas y/o inhibiendo la agregación de proteínas. Aunque la treonina (por ejemplo, a 250 mM) indica un efecto estabilizador menor, la formulación líquida de la presente invención está preferentemente libre de otros aminoácidos.

Además, se prefiere que la presente formulación sea sin cloruro sódico o esté esencialmente libre de este. Por "esencialmente libre" se entiende que la concentración de cloruro de sodio esté cerca de 0 o muy cerca de 0 (cero) mM, por ejemplo, menos de aproximadamente 50 mM, preferiblemente menos de aproximadamente 20 mM, más preferiblemente menos de aproximadamente 10 mM, incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 5 mM y más preferiblemente menos de aproximadamente 2 mM o incluso menos de aproximadamente 1 mM.

En productos biofarmacéuticos, la adición de tensioactivos puede ser útil para reducir la degradación de las proteínas durante el almacenamiento. Los polisorbatos 20 y 80 (Tween 20 y Tween 80) son excipientes bien establecidos para este fin. Sin embargo, debido a los efectos nulos o negativos sobre la estabilidad de los compuestos neutralizantes de GM-CSF, la formulación líquida de la presente invención no comprende preferiblemente ningún tensioactivo.

La concentración de los compuestos respectivos neutralizantes de GM-CSF utilizados es de al menos aproximadamente 100 mg/ml en la formulación líquida que debe almacenarse, congelarse/descongelarse y/o estar listo para su uso. Concentraciones de aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, preferiblemente aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, más preferiblemente aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 180 mg/ml, incluso más preferiblemente aproximadamente 130 mg/ml a aproximadamente 170 mg/ml, incluso más preferiblemente aproximadamente 135 mg/ml a aproximadamente 165 mg/ml, y más preferidos aproximadamente 150 mg/ml se utilizan en la presente invención.

La vida útil de la formulación líquida producida tiene un requisito mínimo preferido de 24 meses entre 2 y 8°C, preferiblemente 36 meses entre 2 y 8°C, más preferiblemente 48 meses entre 2 y 8°C, preferiblemente 60 meses entre 2 y 8°C, o al menos 28 días a temperatura ambiente (25°C±2°C).

La presente invención se refiere a una formulación estable, preferiblemente una formulación líquida estable que sorprendentemente permite el almacenamiento a largo plazo de compuestos neutralizantes de GM-CSF. Esta formulación es útil, en parte, porque es más conveniente utilizar para el paciente, ya que los compuestos neutralizantes de GM-CSF de esta formulación están altamente concentrados para reducir los efectos secundarios como el dolor debido a las inyecciones de gran volumen.

En consecuencia, un aspecto de la invención se basa en el descubrimiento de que las formulaciones que comprenden:

- un compuesto neutralizante de GM-CSF,

- un sistema tampón seleccionado preferentemente de un tampón de histidina, un tampón de acetato y/o un tampón de citrato con un pH preferido de entre 5 y 7,

- y un modificador de la tonicidad preferiblemente seleccionado de azúcares no reductores, como sacarosa o trehalosa, o alcoholes de azúcar, como el manitol o el sorbitol,

se vuelven lo suficientemente estables para el almacenamiento a largo plazo y/o los ciclos de congelación/descongelación y/o las tensiones de cizallamiento (estabilidad durante su agitación). La formulación de la invención tiene muchas ventajas respecto a las formulaciones tamponadas estándar. En un aspecto, la formulación muestra un comportamiento mínimo de agregación en almacenamientos a largo plazo sin efectos nocivos que podrían esperarse con las formulaciones con alto contenido en proteínas. Otras ventajas de la formulación según la invención son: una fragmentación mínima del compuesto neutralizante de GM-CSF y ningún impacto significativo en la bioactividad del compuesto neutralizante de GM-CSF respecto al almacenamiento a largo plazo, y una baja viscosidad de la composición. Finalmente, en una realización preferida, la formulación está libre de otros excipientes como los tensioactivos, otros aminoácidos y/o el cloruro de sodio.

La presente descripción comprende lo siguiente: Formulaciones, en las que el compuesto neutralizante de GM-CSF es un polipéptido, un peptidomimético, un ácido nucleico o una molécula pequeña.

En una descripción preferida, el compuesto neutralizante de GM-CSF (que es preferiblemente un polipéptido y, más preferiblemente, un anticuerpo o un su fragmento funcional) se une solo o se une específicamente a GM-CSF o al receptor de GM-CSF. Se prevé que el receptor de GM-CSF o GM-CSF provenga de un animal, incluyendo, entre otros, a mamíferos tales como animales de laboratorio (roedores como ratas, cobayas, hamsters o ratones, primates no humanos como *Cynomolgus* o macaco *Rhesus*), animales domésticos o mascotas (por ejemplo, perros o gatos), animales de granja o agrícolas (por ejemplo, bovinos, ovinos, caprinos y porcinos) y/o seres humanos. Preferiblemente, el receptor GM-CSF o el propio GM-CSF es un receptor de GM-CSF (*Homo sapiens*) humano o GM-CSF humano, respectivamente, o un GM-CSF no-humano primate o receptor de GM-CSF no-humano primate, respectivamente. Las variantes especialmente preferidas (homólogos) del GM-CSF no-humano primate o receptor de GM-CSF no-humano primate incluyen las del mono gibón (*Nomascus concolor*, también conocido como el gibón de cresta negro occidental) y de los monos de la familia macaca, por ejemplo el mono rhesus (*Macaca mulatta*) y el mono *cynomolgus* (*Macaca fascicularis*). Según una realización particularmente preferida de la invención, el compuesto que se une a GM-CSF o al receptor de GM-CSF (preferiblemente el anticuerpo o sus fragmentos) presenta reactividad cruzada entre humanos y al menos una de las especies de monos mencionadas anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo es capaz de unirse (y neutralizar) tanto al GM-CSF humano como al GM-CSF del mono *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*). Esto es especialmente ventajoso para una molécula de anticuerpos destinada a la administración terapéutica en sujetos humanos, ya que dicho anticuerpo normalmente tendrá que proceder a través de una multitud de pruebas antes de la aprobación reglamentaria, de las cuales ciertas pruebas iniciales involucran especies animales no humanas. Al realizar tales pruebas, es generalmente deseable utilizar como especie no humana una especie que disponga de un alto grado de similitud genética con los seres

humanos (por ejemplo, primates no humanos como el mono *Cynomolgus*), ya que los resultados así obtenidos serán generalmente altamente predictivos de los resultados correspondientes que pueden esperarse al administrar la misma molécula a los seres humanos. Sin embargo, este poder predictivo basado en pruebas con animales depende, al menos parcialmente, de la posibilidad de comparar la molécula, y es muy alto cuando, debido a una reactividad entre especies, la misma molécula terapéutica puede administrarse a los seres humanos y a los modelos animales. Como en esta realización de la invención, cuando una molécula de anticuerpos es reactiva de forma cruzada para el mismo antígeno en seres humanos y en otras especies estrechamente relacionadas, las pruebas se pueden realizar utilizando la misma molécula de anticuerpos en humanos y en esta especie estrechamente relacionada, por ejemplo en una de las especies de monos mencionadas anteriormente. Esto aumenta tanto la eficiencia de las pruebas mismas como el poder predictivo proporcionado por tales pruebas con respecto al comportamiento de tales anticuerpos en los seres humanos, la especie final de interés desde un punto de vista terapéutico. Se prefiere que el anticuerpo o un su fragmento funcional que se adhiera a GM-CSF o al receptor de GM-CSF sea un anticuerpo monoclonal o un su fragmento funcional. Lo mismo ocurre con los compuestos neutralizantes de GM-CSF, que no son anticuerpos ni se derivan de anticuerpos.

En el contexto de la invención, el compuesto neutralizante de GM-CSF es un anticuerpo monoclonal humano.

El compuesto descrito como neutralizante de GM-CSF puede ser un anticuerpo o un su fragmento funcional que se une a un epítipo del GM-CSF de primate humano y no humano. Este epítipo comprende preferentemente los aminoácidos 23-27 (RRLLN) y/o los aminoácidos 65-77 (GLR/QGSLTKLKGPL). La variabilidad en la posición 67 dentro del tramo de la secuencia de aminoácidos 65-77 refleja la heterogeneidad en esta porción de GM-CSF entre, por un lado, GM-CSF humano y gibón (en el que la posición 67 es R) y, por otro lado, monos de la familia macaca, por ejemplo *cynomolgus* y monos rhesus (en el que la posición 67 es Q). Si el epítipo comprende dos tramos de secuencia de aminoácidos que no son adyacentes, como 23-27 (RRLLN) y 65-77 (GLR/QGSLTKLKGPL), el epítipo también puede llamarse epítipo "discontinuo". Dicho epítipo GM-CSF o dicho epítipo discontinuo GM-CSF pueden comprender además los aminoácidos 28-31 (LSRD), aminoácidos 32-33 (TA) y/o aminoácidos 21-22 (EA).

El anticuerpo monoclonal humano o el su fragmento funcional comprende preferentemente en su región variable de cadena pesada un CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las establecidas en las SEQ ID NOs: 1-13 y 56; preferiblemente la región variable de cadena pesada CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO. 2.

Cualquiera de dichas secuencias CDR3 de la región variable de cadena pesada puede existir aún más juntas en una región variable de cadena pesada con la región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO. 14 y la región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO. 15.

Además, el anticuerpo monoclonal humano o el su fragmento funcional pueden comprender en su región variable de cadena ligera un CDR1 que comprenda la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO. 16, un CDR2 que comprenda la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO. 17, y un CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO. 18.

En una descripción especialmente preferida, el anticuerpo monoclonal humano o el su fragmento funcional comprende en su región variable de cadena ligera un CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO. 16, un CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO. 17 y un CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO. 18, y en su región variable de cadena pesada un CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO. 14, un CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO. 15 y un CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las establecidas en SEQ ID NOs: 1-13 y 56, más preferiblemente, SEQ ID NO. 2.

También se describe en este documento un anticuerpo monoclonal humano o su fragmento funcional que comprende en su región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las establecidas en las SEQ ID NOs: 19, 54 y 55. También se describe un anticuerpo monoclonal humano o su fragmento funcional que comprende en su región variable de cadena pesada una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las establecidas en las SEQ ID NOs: 20-33, 52 y 53. El anticuerpo monoclonal humano o el su fragmento funcional pueden comprender una secuencia de aminoácidos de cadena ligera como se establece en SEQ ID NO. 34 y/o una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en cualquiera de las SEQ ID NOs: 35-48, más preferiblemente SEQ ID NO. 35.

También se describe un anticuerpo monoclonal humano o su fragmento funcional que puede comprender una o más secuencias de aminoácidos que tengan al menos un 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de homología con la secuencia de aminoácidos respectiva según lo establecido en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-48 y 52-56, preferiblemente con la secuencia de aminoácidos respectiva como se establece en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-18 y 56 y/o con la secuencia de aminoácidos de las regiones marco (FR) dentro de la secuencia de aminoácidos según se establece en cualquiera de las SEQ ID NOs: 19-48 y 52-55. Por lo tanto, se describe un anticuerpo monoclonal humano o su fragmento funcional que puede comprender una o más secuencias de aminoácidos que

tengan al menos un 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de homología con la secuencia de aminoácidos respectiva como se establece en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-18 y 56.

5 Alternativamente, en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de una CDR establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-18 y 56, pueden ser sustituidos uno, dos, tres cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o 10 aminoácidos. Preferiblemente, tal CDR que tenga sustituciones sigue siendo capaz de unirse a GM-CSF como se describe en el presente documento.

10 Como alternativa o además, se describe que el anticuerpo monoclonal humano o el su fragmento funcional pueda comprender una o más secuencias de aminoácidos que tengan al menos un 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de homología con la respectiva secuencia de aminoácidos de una región VH, VL, H o L, respectivamente, según se establece en cualquiera de las SEQ ID NOs:19-48 y 52-55. Se describe que la homología es con respecto a toda la secuencia de aminoácidos VH, VL, H o L. En esta descripción, la homología es referida a dentro de las CDR como se describe antes o a la homología dentro de las FR (o no CDR) de tal región VH, VL, H o L como se establece en cualquiera de las SEQ ID NOs:19-48 y 52-55. En consecuencia, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 25 aminoácidos pueden sustituirse en cada una de las FR. Tal variante de sustitución FR todavía es capaz de unirse a GM-CSF como se describe en el presente documento.

15 Los expertos en la técnica pueden identificar fácilmente las FR (o no CDR) dentro de las SEQ ID NOs: 19-48 y 52-55, ya que las SEQ ID NOs: 1-18 y 56 muestran secuencias CDR compuestas en una o más de las secuencias VH, VL, H o L mostradas en las SEQ ID NOs: 19-48 y 52-55. A saber, la lista de secuencias proporciona en el identificador de secuencia <223> la designación de cada una de las secuencias de aminoácidos. Las designaciones idénticas indican que estas secuencias de aminoácidos "pertenecen" juntas, lo que significa que un CDR está contenido en una región VH, VL, H o L, por ejemplo, las SEQ ID NOs: 16, 17, 18 son secuencias de aminoácidos de CDR que se encuentran en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO. 19 (ya que todos ellos están designados como "5-306").

20 A modo de ilustración adicional, si los aminoácidos se sustituyen en uno, o más, o en todos los CDR o FR de la cadena pesada y/o ligera, se prefiere que la secuencia "sustituida" obtenida en ese momento sea al menos un 70%, más preferiblemente 80%, incluso más preferiblemente 90%, especial y preferiblemente 95%, más particularmente, preferiblemente un 98% o 99% idéntica con la secuencia "original" CDR o FR. Esto significa que depende de la longitud del CDR o FR en qué grado será homóloga con la secuencia "sustituida".

25 La homología está determinada por programas de alineación de secuencias estándar como el Vector NTI (InforMax™, Maryland, EE. UU.) o, más preferiblemente, por el programa BLASTP, preferentemente la versión blastp 2.2.5 (16 de noviembre de 2002; cfr. Altschul, S. F. et al. (1997) Nucl. Acids Res. 25, 3389-3402). El porcentaje de homología se basa en la alineación de todas las secuencias de polipéptidos (matriz: BLOSUM 62; costes de huecos: 11,1; valor de corte establecido en 10^{-3}) utilizando cualquiera de la secuencia de aminoácidos CDR, VH, VL, H o L como referencia en una comparación por pares. Se calcula como el porcentaje de números de "positivos" (aminoácidos homólogos) indicados como resultado en la salida del programa BLASTP dividido por el número total de aminoácidos seleccionados por el programa para la alineación.

30 Cuando se utiliza en el presente documento, la homología de las secuencias de aminoácidos o nucleótidos se puede utilizar indistintamente con el término "identidad". El término "homología" que se utiliza en la presente invención significa el porcentaje de residuos idénticos en pares —tras la alineación homológica de una secuencia de una secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos de la presente invención con una secuencia en cuestión— con respecto al número de residuos en el mayor tramo de estas dos secuencias. Como se describió anteriormente, los programas para determinar la homología (o identidad) comparan secuencias alineadas sobre una base de aminoácidos por aminoácidos, y se pueden establecer en varios niveles de estrictencia para su comparación (por ejemplo, aminoácido idéntico, sustitución conservadora de aminoácidos, etc.). Según se utiliza el término en este documento, dos aminoácidos en cuestión se consideran "sustituciones conservadoras" entre sí si cada uno pertenece a la misma clase química, es decir, ácido, no polar / hidrófobo, polar sin carga y básico. A modo de ejemplo no limitador, dos aminoácidos diferentes pertenecientes a la clase de aminoácidos no polares se considerarían "sustituciones conservadoras" entre sí, incluso si estos dos aminoácidos no fueran idénticos, mientras que un aminoácido no polar por un lado y un aminoácido básico por otro no se considerarían "sustituciones conservadoras" entre sí. El Panel 3.1 de "Molecular Biology of the Cell", 4ª Edición (2002), de Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts y Walter agrupa a los aminoácidos en cuatro grupos principales: ácido, no polar, polar sin carga y básico. Dicha agrupación puede utilizarse para determinar, en el contexto de la presente invención, si un aminoácido determinado es o no una sustitución conservadora de otro aminoácido en cuestión. Los grupos principales mencionados anteriormente pueden ser subclasificados, por ejemplo, en pequeños aminoácidos no polares y grandes no polares, grandes aminoácidos aromáticos, etc. La expresión "sustitución conservadora de aminoácidos" también indica cualquier sustitución de aminoácidos por un determinado residuo de aminoácidos, cuando el residuo sustituto es tan químicamente similar al del residuo dado que no hay ninguna disminución sustancial en los resultados de la función polipeptídica (por ejemplo, la unión).

60 El compuesto neutralizante de GM-CSF se formula típicamente como una composición farmacéutica para la administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica

a un sujeto, por lo que se prefiere la administración subcutánea. La composición farmacéutica de la invención es una composición líquida, específicamente una composición acuosa.

La concentración del compuesto neutralizante de GM-CSF en la composición farmacéutica líquida es de al menos 100 mg/ml, incluso más preferiblemente entre unos 100 mg/ml y unos 200 mg/ml, tal como aprox. 150 mg/ml.

5 Cuando la composición está destinada a la administración subcutánea, se pueden utilizar concentraciones más altas del compuesto neutralizante de GM-CSF.

Como se señaló anteriormente, las composiciones comprenden un tampón. Como se utiliza en el presente documento, el término "tampón" se refiere a una composición añadida que permite que una formulación líquida resista los cambios en el pH. En ciertas realizaciones, el tampón añadido permite que una formulación líquida resista los cambios en el pH mediante la acción de sus componentes conjugados ácidos y básicos. Ejemplos de tampones adecuados incluyen, entre otros, un sistema de histidina, acetato o citrato tamponado; en la presente invención, se usa la histidina.

La expresión "se une específicamente" o expresiones conexas tales como "unión específica", "se une específicamente", "enlazante específico", etc., tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la capacidad del compuesto neutralizante de GM-CSF y, preferiblemente, al anticuerpo (humano) (monoclonal) o su fragmento funcional para discriminar entre su diana (por ejemplo, GM-CSF o el receptor de GM-CSF) y cualquier otro antígeno potencial diferente del GM-CSF o del receptor GM-CSF hasta tal punto que, a partir de una pluralidad de antígenos diferentes como posibles parejas de unión, sólo GM-CSF/el receptor de GM-CSF está unido, o está significativamente unido. En el sentido de la invención, una diana está unida "significativamente" cuando, entre una pluralidad de antígenos diferentes igualmente accesibles como posibles parejas de unión, la diana está unida al menos 10 veces, preferiblemente al menos 50 veces, preferiblemente al menos 100 veces o más frecuentemente (en un sentido cinético) que cualquier otro antígeno diferente de la diana. Estas mediciones cinéticas se pueden realizar, por ejemplo, utilizando tecnología SPR, como un instrumento Biacore. Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "se une (específicamente) a" o términos relacionados como "reconoce (específicamente)", "se dirige a", "interactúa (específicamente) con" y "reacciona (específicamente) con" significan, de acuerdo con esta invención, que un compuesto neutralizante de GM-CSF (por ejemplo, un anticuerpo) exhibe una afinidad apreciable por su diana (por ejemplo, GM-CSF o el receptor de GM-CSF) y, generalmente, no presenta ninguna reactividad significativa con proteínas o antígenos distintos de las dianas antes mencionadas. La "afinidad apreciable" incluye la unión con una afinidad de aproximadamente 10^{-6} M (KD) o más fuerte, como 10^{-7} M o más fuerte. Preferiblemente, la unión se considera específica cuando la afinidad del enlace es de aproximadamente 10^{-11} a 10^{-8} M, preferiblemente de aproximadamente 10^{-11} a 10^{-9} M, más preferiblemente de aproximadamente 10^{-11} a 10^{-10} M. Si un compuesto (por ejemplo, un anticuerpo) reacciona específicamente, o se une a una diana, este puede ser probado fácilmente, entre otras cosas, comparando la reacción de dicho compuesto con su proteína o antígeno diana con la reacción de dicho compuesto con proteínas o antígenos distintos de su diana. Preferiblemente, un compuesto según la invención no se une esencialmente o no es capaz de unirse a proteínas o antígenos distintos de GM-CSF o el receptor de GM-CSF. La expresión "no se une esencialmente" o "no es capaz de unirse" significa que los compuestos de la presente invención no muestran reactividad de más del 30%, preferiblemente más del 20%, más preferiblemente más del 10%, particularmente preferiblemente más del 9%, 8%, 7%, 6% o 5% con proteínas o antígenos distintos de GM-CSF o el receptor de GM-CSF.

Tal como se utiliza en el presente documento, "neutralización", "neutralizador", "neutralizante" y las variaciones gramaticalmente relacionadas con ellos se refieren a la atenuación parcial o completa de los efectos biológicos de GM-CSF. Dicha atenuación parcial o completa de los efectos biológicos de GM-CSF es el resultado de la modificación, interrupción y/o derogación de procesos mediados por GM-CSF, como la transducción de señales, como se manifiesta, por ejemplo, en la señalización intracelular, la proliferación celular o la liberación de sustancias solubles, la regulación positiva o negativa de la activación del gen intracelular, que da como resultado, por ejemplo, la expresión de receptores de superficie para ligandos distintos de GM-CSF. Como entienden los expertos en la técnica, existen múltiples modos para determinar si un compuesto, por ejemplo un anticuerpo o un su fragmento funcional, debe clasificarse como neutralizador. Por ejemplo, esto puede lograrse mediante una prueba in vitro estándar realizada de la siguiente manera: En un primer experimento de proliferación, una línea celular, cuyo grado de proliferación se sabe que depende de la actividad de GM-CSF, se incuba con una serie de muestras con diferentes concentraciones de GM-CSF, después de cuya incubación se mide el grado de proliferación de la línea celular. A partir de esta medición, se determina la concentración de GM-CSF permitiendo la proliferación media-máxima de las células. A continuación, se realiza un segundo experimento de proliferación empleando en cada una de las series de muestras el mismo número de células que se utilizaron en el primer experimento de proliferación, la concentración antes determinada de GM-CSF y, en este caso, variando las concentraciones del compuesto sospechoso de ser un neutralizador de GM-CSF. La proliferación celular se mide de nuevo para determinar la concentración del compuesto analizado que es suficiente para causar la inhibición del crecimiento medio máximo. Si el gráfico resultante de la inhibición del crecimiento frente a la concentración del compuesto analizado es de forma sigmoideal, lo que resulta en una disminución de la proliferación celular con el aumento de la concentración del compuesto analizado, entonces se ha realizado cierto grado de inhibición del crecimiento, es decir, la actividad de GM-CSF se ha neutralizado en cierta medida. En tal caso, el compuesto en cuestión puede considerarse un "neutralizador" en el sentido de la presente invención. Un ejemplo de una línea celular, cuyo grado de proliferación

se sabe que depende de la actividad de GM-CSF, es la línea celular TF-1, como se describe en Kitamura, T. et al. (1989). J Cell Physiol 140, 323-34.

5 Como entienden los expertos en la técnica, el grado de proliferación celular no es el único parámetro por el cual se puede establecer la capacidad neutralizadora GM-CSF. Por ejemplo, la medición del nivel de moléculas de señalización (por ejemplo, citoquinas), cuyo nivel de secreción depende de GM-CSF, puede utilizarse para identificar un presunto compuesto de neutralizador de GM-CSF/inhibidor de GM-CSF).

10 Otros ejemplos de líneas celulares que se pueden utilizar para determinar si un compuesto en cuestión, tal como un anticuerpo o un su fragmento funcional, es un neutralizador de la actividad de GM-CSF, incluyen AML-193 (Lange, B. et al. (1987). Blood 70, 192-9); GF-D8 (Rambaldi, A. et al. (1993). Blood 81, 1376-83); (1990). Experimental Hematology 18, 1108-11); MO7E (Avanzi, G. C. et al. (1990). Journal of Cellular Physiology 145, 458-64); TALL-103 (Valtieri, M. et al. (1987). Journal of Immunology 138, 4042-50); y UT-7 (Komatsu, N. et al. (1991). Cancer Research 51, 341-8).

15 Se entiende que la neutralización de GM-CSF, en línea con la presente descripción, puede realizarse fuera de las células que llevan los receptores de GM-CSF o dentro de dichas células. Por lo tanto, la neutralización de GM-CSF por un compuesto puede ser una inhibición o prevención de la unión de GM-CSF a su receptor específico o una inhibición de la señal intracelular inducida por una unión de las citoquinas a sus receptores. Un compuesto neutralizante de GM-CSF puede, por ejemplo, unirse a GM-CSF directamente o al receptor de GM-CSF, interfiriendo así en ambos casos con los efectos biológicos de GM-CSF.

20 Como se definió anteriormente, los inhibidores de GM-CSF se pueden seleccionar del grupo que consiste en un polipéptido, un peptidomimético, una molécula de ácido nucleico y una molécula pequeña.

25 El término "polipéptido", tal y como se utiliza en este documento, describe un grupo de moléculas que generalmente consiste en al menos 30 aminoácidos acoplados entre sí a través de un enlace peptídico covalente. De acuerdo con la descripción, el grupo de polipéptidos comprende "proteínas" que consisten en un solo polipéptido o más de un polipéptido. El término "polipéptido" también describe fragmentos de proteínas siempre y cuando estos fragmentos consistan en al menos 30 aminoácidos. Es bien sabido en la técnica que los polipéptidos pueden formar multímeros tales como dímeros, trímeros y oligómeros superiores, es decir, que consisten en más de una molécula polipeptídica. Estos multímeros también se incluyen en la definición del término "polipéptido". Las moléculas polipeptídicas que forman tales dímeros, trímeros, etc. pueden ser idénticas o no serlo. Las estructuras de orden superior correspondientes de dichos multímeros son, por lo tanto, denominadas homo- o heterodímeros, homo- o heterotrímeros, etc. Un ejemplo de heteromultímero es una molécula de anticuerpo, que, en su forma natural, consiste en dos cadenas de polipéptidos ligeros idénticas y dos cadenas de polipéptidos pesados idénticas. Los términos "polipéptido" y "proteína" también se refieren a polipéptidos/proteínas modificados naturalmente o no, en los que la modificación se realiza, por ejemplo, mediante modificaciones post-traduccionales como la glicosilación, acetilación, fosforilación, formación de puentes de disulfuro y similares o por modificaciones químicas como la PEGilación. Tales modificaciones son habituales en la técnica.

35 La expresión "ácido nucleico" o "polinucleótido" define, en el contexto de la invención, macromoléculas poliméricas que consisten en múltiples unidades de repetición de ácido fosfórico, azúcares y bases de purina y pirimidina. Las realizaciones de estas moléculas incluyen ADN, ARN y ANP. El ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario, lineal o circular. El ácido nucleico, en el contexto de la invención, es un aptámero. Los aptámeros de ácido nucleico son moléculas de ADN o ARN que han sido seleccionadas de grupo aleatorios en función de su capacidad para unirse a otras moléculas. Se han seleccionado aptámeros que se unen a ácidos nucleicos, proteínas, pequeños compuestos orgánicos e incluso organismos enteros. Consisten en cadenas generalmente cortas de oligonucleótidos, típicamente de 50 bases o menos.

40 La expresión "molécula pequeña" define un grupo de compuestos farmacéuticos orgánicos que tienen un peso molecular de menos de 1000 Daltons, preferiblemente hasta 800 Daltons y, más preferiblemente, de 300 a 700 Daltons. El límite de peso molecular superior para una molécula pequeña proporciona la posibilidad de que se difunda rápidamente a través de las membranas celulares para que puedan llegar a sitios intracelulares de acción. Las moléculas pequeñas correspondientes se pueden derivar de una biblioteca de péptidos al menos parcialmente aleatorizada. Las bibliotecas de moléculas pequeñas adecuadas según la presente invención son habituales en la técnica y/o se pueden comprar a distribuidores comerciales.

45 El término "peptidomimético" describe una pequeña cadena tipo proteica diseñada para imitar a péptidos. Este tipo de moléculas se deriva artificialmente mediante la modificación de un péptido existente con el fin de alterar las propiedades de la molécula. Por ejemplo, el péptido principal existente se modifica para cambiar la estabilidad o la actividad biológica de la molécula. Estas modificaciones comprenden la alteración de la estructura y la incorporación de aminoácidos no naturales.

55 La expresión "receptor de GM-CSF" se refiere al receptor fisiológico de la superficie celular de GM-CSF, que se describe en la técnica como un heterómero de una cadena alfa (CD116) y una subunidad beta común (beta-c).

Una realización preferida de un polipéptido neutralizante es un anticuerpo o sus fragmentos funcionales, más preferiblemente un anticuerpo humano o sus fragmentos funcionales. Las técnicas para la producción de anticuerpos son habituales en la técnica y se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 y Harlow y Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

La definición del término "anticuerpo" incluye realizaciones tales como anticuerpos monoclonales, quiméricos, de cadena sencilla, humanizados y humanos. Además de los anticuerpos de longitud completa, la definición también incluye derivados de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, como, entre otros, fragmentos de Fab. Los fragmentos de anticuerpos o derivados comprenden además $F(ab')_2$, Fv, fragmentos de scFv o anticuerpos de dominio único, como los anticuerpos de dominio o los nanocuerpos, anticuerpos de dominio variable único o de dominio variable único de inmunoglobulina que comprenden un solo dominio variable, que podría ser VHH, VH o VL, que se unen específicamente a un antígeno o epítipo, independientemente de otras regiones o dominios V; véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) y (1999), loc. cit.; Kontermann y Dübel, Antibody Engineering, Springer, 2ª ed. 2010 y Little, Recombinant Antibodies for Immunotherapy, Cambridge University Press 2009. Dicho término también incluye diacuerpos o anticuerpos de reorientación de doble afinidad (DART). Se prevén más diacuerpos monocatenario (bienespecíficos), diacuerpos en tándem (Tandab), "minicuerpos" ejemplificados por una estructura que es la siguiente: $(VH-VL-CH3)_2$, $(scFv-CH3)_2$ o $(scFv-CH3-scFv)_2$, "Fc DART" e "IgG DART", multicuerpos como triacuerpos. Los dominios variables únicos de inmunoglobulina abarcan no sólo un polipéptido de dominio variable único de anticuerpos aislado, sino también polipéptidos más grandes que comprenden uno o más monómeros de una secuencia de polipéptidos de dominio variable único de anticuerpos.

Además, el término "anticuerpo", tal como se emplea en el presente documento, también se refiere a derivados o variantes de los anticuerpos descritos en el presente documento que muestran la misma especificidad que los anticuerpos descritos. Ejemplos de "variantes de anticuerpos" incluyen variantes humanizadas de anticuerpos no humanos, anticuerpos "maturados de afinidad" (véase, por ejemplo, Hawkins et al. J. Mol. 254, 889-896 (1992) y Lowman et al., Biochemistry 30, 10832-10837 (1991)) y mutantes de anticuerpos con funciones efectoras alteradas (véase, por ejemplo, U.S. Pat. No 5.648.260, Kontermann y Dübel (2010), loc. cit. y Little (2009), loc. cit.).

El término "anticuerpo" también comprende inmunoglobulinas (Ig) de diferentes clases (es decir, IgA, IgG, IgM, IgD e IgE) y subclases (como IgG1, IgG2, etc.). Los derivados de los anticuerpos, que también entran en la definición del término anticuerpo en el significado de la invención, incluyen modificaciones de moléculas tales como, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación, formación de enlace de disulfuro, farnesilación, hidroxilación, metilación o esterificación.

Un fragmento funcional de un anticuerpo incluye el dominio de un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento Fab, scFv o construcciones que comprenden dominios variables de inmunoglobulina únicos o polipéptidos de anticuerpos de dominio único, por ejemplo, dominios variables de cadena pesada única o dominios variables de cadena ligera única, así como otros fragmentos de anticuerpos como se describe en el presente documento. El $F(ab')_2$ o Fab puede ser diseñado para minimizar o eliminar completamente las interacciones de disulfuro intermoleculares que se producen entre los dominios C_{H1} y C_L .

La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en el presente documento, debe entenderse en el sentido de que el anticuerpo o su fragmento funcional, comprende una o varias secuencias de aminoácidos contenidas en el repertorio humano de anticuerpos germinales. Por lo tanto, a los efectos de la definición en el presente documento, un anticuerpo, o su fragmento, puede considerarse humano si consiste en dicha o dichas secuencias de aminoácidos germinales humanos, es decir, si las secuencias de aminoácidos del anticuerpo en cuestión o sus fragmentos funcionales son idénticas a la secuencia o secuencias de aminoácidos germinales humanas. Un anticuerpo o su fragmento funcional también puede considerarse humano si consiste en una o varias secuencias que se desvían de su secuencia o secuencias germinales humanas más cercanas en no más de lo que se esperaría debido a la impresión de la hipermutación somática. Además, los anticuerpos de muchos mamíferos no humanos, por ejemplo roedores como los ratones y las ratas, comprenden secuencias de aminoácidos VH CDR3 que se puede esperar que existan en el repertorio de anticuerpos humanos expresado también. Cualquier secuencia o secuencias de origen humano o no humano que puedan esperarse que existan en el repertorio humano expresado también se considerarán "humanas" a los efectos de la presente invención. Por lo tanto, la expresión "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes que corresponden sustancialmente a las secuencias de inmunoglobulina germinal humanas conocidas en la técnica, incluidas, por ejemplo, las descritas por Kabat et al. (véase Kabat et al. (1991) loc. cit.). Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio in vitro o por mutación somática in vivo), por ejemplo en los CDR y, en particular, en el CDR3. El anticuerpo humano puede tener al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o más posiciones reemplazadas por un residuo de aminoácidos que no esté codificado por la secuencia de inmunoglobulina germinal humana.

Los anticuerpos humanos o sus fragmentos funcionales de la invención son monoclonales. Es particularmente difícil preparar anticuerpos humanos que sean monoclonales. A diferencia de las fusiones de células B murinas con líneas celulares inmortalizadas, las fusiones de células B humanas con líneas celulares inmortalizadas no son viables. Por

lo tanto, los anticuerpos monoclonales humanos son el resultado de la superación de obstáculos técnicos significativos, generalmente conocidos, que existen en el campo de la tecnología de anticuerpos. La naturaleza monoclonal de los anticuerpos los hace especialmente adecuados para su uso como agentes terapéuticos, ya que dichos anticuerpos existirán como una única especie molecular homogénea que puede ser bien caracterizada y reproduciblemente fabricada y purificada. Estos factores dan lugar a productos cuyas actividades biológicas pueden predecirse con un alto nivel de precisión, muy importante si estas moléculas van a obtener la aprobación reglamentaria para la administración terapéutica en seres humanos. La expresión "anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones naturales y/o modificaciones posteriores a la traducción (por ejemplo, isomerizaciones, amidaciones) que puedan estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones convencionales de anticuerpos (policlonales), que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque son sintetizados por el cultivo del hibridoma y no están contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo según es obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizarán de acuerdo con la presente invención pueden ser fabricados por el método de hibridoma descrito primero por Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), o pueden hacerse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, U.S. Pat. No 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de las bibliotecas de anticuerpos de fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales o los correspondientes fragmentos funcionales de la invención son anticuerpos humanos o los fragmentos funcionales correspondientes. Al contemplar agentes de anticuerpos destinados a la administración terapéutica a los seres humanos, es muy ventajoso que los anticuerpos sean de origen humano. Después de la administración a un paciente humano, el anticuerpo humano o su fragmento funcional muy probablemente no provocará una fuerte respuesta inmunogénica por el sistema inmunitario del paciente, es decir, no será reconocido como una proteína ajena como es una proteína no humana. Esto significa que no se generarán anticuerpos frente al huésped, es decir, del paciente contra el anticuerpo terapéutico que de otro modo bloquearía la actividad del anticuerpo terapéutico y/o aceleraría la eliminación del anticuerpo terapéutico del cuerpo del paciente, evitando así que se pueda ejercer el efecto terapéutico deseado.

El anticuerpo monoclonal humano o su fragmento funcional que se va a utilizar con fines farmacéuticos presenta reactividad entre la especie humana y, al menos, una especie de mono. También se prefiere la misma reactividad entre especies cruzadas para todos los demás compuestos neutralizadores/inhibidores derivados de anticuerpos o no anticuerpos de GM-CSF.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo IgG. Un isotipo IgG comprende no sólo las regiones de anticuerpos variables de las cadenas pesadas y ligeras responsables del reconocimiento y unión de antígenos altamente discriminatorios, sino también las regiones constantes de las cadenas de polipéptidos de anticuerpos pesados y ligeros normalmente presentes en anticuerpos producidos "naturalmente" y, en algunos casos, incluso modificaciones en uno o más sitios con carbohidratos. Esta glicosilación es generalmente un sello distintivo del formato IgG, y se encuentra en las regiones constantes que comprenden la llamada región Fc de un anticuerpo completo que se sabe que provoca varias funciones efectoras in vivo. Además, la región fc media la unión de IgG al receptor Fc, así como facilita el desplazamiento del IgG a lugares con mayor presencia del receptor Fc, por ejemplo, hacia tejidos inflamados. Ventajosamente, el anticuerpo IgG es un anticuerpo IgG1 o un anticuerpo IgG4, formatos que son preferidos ya que su mecanismo de acción in vivo está particularmente bien comprendido y caracterizado. Este es especialmente el caso de los anticuerpos IgG1.

El fragmento funcional del anticuerpo puede ser preferiblemente un scFv, un anticuerpo de dominio único, un Fv, un anticuerpo VHH, un diacuerpo, un diacuerpo en tándem, un Fab, un Fab' o un F(ab')₂. Estos formatos generalmente pueden dividirse en dos subclases, a saber, las que consisten en una sola cadena de polipéptidos, y las que comprenden al menos dos cadenas de polipéptidos. Los miembros de la subclase anterior incluyen un scFv (que comprende una región VH y una región VL unida en una sola cadena de polipéptidos a través de un enlazante polipeptídico); un anticuerpo de dominio único (que comprende una única región variable de anticuerpos) como un anticuerpo VHH (que comprende una sola región VH). Los miembros de esta última subclase incluyen un Fv (que comprende una región VH y una región VL como cadenas de polipéptidos separadas que no están asociadas covalentemente entre sí); un diacuerpo (que comprende dos cadenas de polipéptidos no asociadas covalentemente, cada una de las cuales comprende dos regiones variables de anticuerpos —normalmente una VH y una VL por cadena de polipéptidos—, las dos cadenas de polipéptidos dispuestas en una conformación de cabeza a cola de modo que se produce una molécula de anticuerpos bivalente); un diacuerpo en tándem (anticuerpos Fv biespecíficos de una sola cadena que comprenden cuatro regiones de inmunoglobulina ligada covalentemente —VH y VL— de dos especificidades diferentes, formando un homodímero que es dos veces más grande que el diacuerpo descrito anteriormente); un Fab (que comprende como una cadena de polipéptidos toda una cadena de anticuerpos, que comprende una región VL y toda la región constante de la cadena ligera y, como otra cadena de polipéptidos, una

parte de una cadena pesada de anticuerpos que comprende una región completa de VH y parte de la región constante de la cadena pesada, estando conectadas intermolecularmente dichas dos cadenas de polipéptidos a través de un enlace intercatenario de disulfuro); un Fab' (como un Fab, anterior, excepto con enlaces de disulfuro reducidos adicionales compuestos en la cadena pesada de anticuerpos); y un F(ab)2 (que comprende dos moléculas de Fab', estando unida cada molécula de Fab' a la otra molécula de Fab' respectiva a través de enlaces de disulfuro entre cadenas). En general, los fragmentos funcionales de anticuerpos del tipo descrito anteriormente permiten una gran flexibilidad en la configuración, por ejemplo, las propiedades farmacocinéticas de un anticuerpo deseado para la administración terapéutica a las exigencias particulares a mano. Por ejemplo, puede ser deseable reducir el tamaño del anticuerpo administrado con el fin de aumentar el grado de penetración al tejido al tratar tejidos que se sabe que están mal vascularizados (por ejemplo, las articulaciones). En algunas circunstancias, también puede ser deseable aumentar la velocidad a la que se elimina el anticuerpo terapéutico del cuerpo, siendo dicha tasa generalmente acelerable al disminuir el tamaño del anticuerpo administrado. Un fragmento de anticuerpo se define como un fragmento de anticuerpo funcional en el contexto de la invención, siempre y cuando el fragmento mantenga las características de unión específicas para el epítipo/diana del anticuerpo principal, es decir, siempre y cuando se adhiera específicamente a GM-CSF o al receptor GM-CSF.

Según una nueva realización de la invención, dicho anticuerpo o fragmento funcional de la misma puede estar presente en formas monovalentes mono-específicas; multivalentes mono-específicas, en particular mono-específicas bivalentes; o multivalentes multi-específicas, en particular bivalentes bio-específicas. En general, un anticuerpo mono-específico multivalente, en particular bivalente mono-específico como un IgG humano completo, como se describe en el presente documento anteriormente puede traer consigo la ventaja terapéutica de que la neutralización realizada por dicho anticuerpo se potencia por efectos de avidéz, es decir, la unión por el mismo anticuerpo a múltiples moléculas del mismo antígeno, el propio GM-CSF o el receptor de GM-CSF. Se han descrito anteriormente varias formas monovalentes mono-específicas de fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, un scFv, un Fv, un VHH o un solo anticuerpo de dominio). Las formas multivalentes multi-específicas, en particular las bio-específicas bivalentes de un anticuerpo, pueden incluir una IgG completa en la que un brazo de unión se une al GM-CSF/receptor de GM-CSF del primate, mientras que el otro brazo de unión se une a otro antígeno distinto del GM-CSF/receptor de GM-CSF. Otra forma multivalente multi-específica, en particular, bivalente bio-específica puede ser ventajosamente un anticuerpo bio-específico monocatenario humano, es decir, una construcción de anticuerpo humano recombinante que comprenda dos entidades scFv como se ha descrito anteriormente, conectadas en una cadena de polipéptidos contiguos por un espaciador de polipéptido interpuesto corto como se conoce generalmente en la técnica (véase por ejemplo el documento WO 99/54440 para un anticuerpo monocatenario bi-específico anti-CD19 x anti-CD3). En este caso, una porción de scFv del anticuerpo monocatenario bio-específico compuesto dentro del anticuerpo bio-específico monocatenario se unirá específicamente al receptor GM-CSF/GM-CSF como se ha establecido anteriormente, mientras que la otra porción respectiva de scFv de este anticuerpo monocatenario bio-específico se unirá a otro antígeno determinado que tenga beneficio terapéutico.

Según una realización más, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos pueden derivarse, por ejemplo con un polímero orgánico, por ejemplo con una o más moléculas de polietilenglicol ("PEG") y/o polivinil pirrolidona ("PVP"). Como se conoce en la técnica, dicha derivatización puede ser ventajosa en la modulación de las propiedades farmacodinámicas de los anticuerpos o sus fragmentos funcionales. Especialmente preferidos son las moléculas de PEG derivatizadas como PEG-maleimida, permitiendo la conjugación con el anticuerpo o su fragmento funcional de una manera específica al sitio a través del grupo sulfhidrilo de un aminoácido de cisteína. De ellos, son especialmente preferidos PEG-maleimida de 20 kD y/o 40 kD, ya sea en forma ramificada o en cadena lineal. Puede ser especialmente ventajoso aumentar el peso molecular efectivo de fragmentos de anticuerpos humanos más pequeños anti-GM-CSF, tales como los fragmentos de scFv mediante el acoplamiento de este último a una o más moléculas de PEG, especialmente PEG-maleimida.

Los anticuerpos descritos en este documento también incluyen anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie en particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas son idénticas u homólogas con respecto a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada (U.S. Pat. No. 4.816.567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en este caso incluyen anticuerpos "primitizados" que comprenden secuencias de unión de antígenos de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, Mono del Viejo Mundo, simio, etc.) y secuencias de regiones constantes humanas.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o sus fragmentos (como Fv, Fab, Fab', F(ab')2 u otras subsecuencias de antígenos de anticuerpos) de secuencias humanas en su mayoría, que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpos receptores) en las que los residuos de una región hipervariable (también CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo del donante) como el ratón, la rata o el conejo que tienen la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la inmunoglobulina humana de la región marco de Fv (FR) se sustituyen por los residuos no humanos

correspondientes. Además, los "anticuerpos humanizados", tal y como se utilizan en el presente documento también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo del receptor ni en el anticuerpo del donante. Estas modificaciones se realizan para perfeccionar y optimizar aún más el rendimiento de los anticuerpos. El anticuerpo humanizado de manera óptima también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992).

5

10

Tal y como se utiliza en el presente documento, la numeración de los residuos de aminoácidos o las posiciones del GM-CSF humano y de primate no humano se refiere a la de GM-CSF maduro, es decir, GM-CSF sin su secuencia señal de 17 aminoácidos (la longitud total de GM-CSF madura en las especies de humanos y primates no humanos descritas anteriormente es de 127 aminoácidos). La secuencia de GM-CSF humana y GM-CSF de gibón es la siguiente:

SEQ ID NO: 49

APARSPSPST QPWEHVNAIQ EARRLLNLSR DTAAEMNETV EVISEMFDLQ
EPTCLQTRLE LYKQGLRGSL **TKLKGPL**TMM ASHYKQHCPP TPETSCATQI
ITFESFKENL KDFLLVIPFD CWEPVQE

15

La secuencia de GM-CSF en ciertos miembros de la familia de monos macaca como, por ejemplo, el mono Rhesus y el mono Cynomolgus es la siguiente:

SEQ ID NO: 50

APARSPSPGT QPWEHVNAIQ EARRLLNLSR DTAAEMNKTV EVVSEMFDLQ
EPSCLQTRLE LYKQGLQGSL **TKLKGPL**TMM ASHYKQHCPP TPETSCATQI
ITFQSFKENL KDFLLVIPFD CWEPVQE

La secuencia de GM-CSF humana también se muestra en SEQ ID NO.57. La de GM-CSF de gibón también se muestra en SEQ ID NO. 58:

20

APARSPSPST QPWEHVNAIQ EARRLLNLSR DTAAEMNETV EVISEMFDLQ
EPTCLQTRLE LYKQGLRGSL **TKLKGPL**TMM ASHYKQHCPP TPETSCATQI
ITFESFKENL KDFLLVIPFD CWEPVQE

(SEQ ID NO.57 y 58)

La secuencia de GM-CSF en ciertos miembros de la familia de monos macaca como, por ejemplo, el mono Rhesus (SEQ ID NO.59) y el mono Cynomolgus (SEQ ID NO.60) también es la siguiente:

25

APARSPSPGT QPWEHVNAIQ EARRLLNLSR DTAAEMNKTV EVVSEMFDLQ
EPSCLQTRLE LYKQGLQGSL **TKLKGPL**TMM ASHYKQHCPP TPETSCATQI
ITFQSFKENL KDFLLVIPFD CWEPVQE

(SEQ ID NO. 59 y 60)

El epítipo mínimo, ventajosamente un epítipo discontinuo como se describe en el presente documento, unido por el anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal humano (o su fragmento funcional) se indica en la secuencia o secuencias de GM-CSF que se muestra más arriba en negrita.

30

El anticuerpo monoclonal humano neutralizante de GM-CSF o su fragmento funcional, que se une a GM-CSF, se une asimismo a un epítipo de GM-CSF que comprende preferiblemente los aminoácidos 23-27 (RRLN) y/o los aminoácidos 65-77 (GLR/QGSLTKLKGPL). Estos tramos de la secuencia de aminoácidos están indicados en la secuencia GM-CSF anterior en negrita. El término "epítipo" se refiere a un sitio en un antígeno o una diana (por ejemplo, GM-CSF) al que un compuesto, tal como un anticuerpo o su fragmento funcional, se une específicamente. Dicha unión/interacción también se entiende que define a un "reconocimiento específico". Los "epítipos" pueden formarse tanto por aminoácidos contiguos como por aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegado terciario de una proteína. Un "epítipo lineal" es un epítipo en el que una secuencia primaria de aminoácidos comprende el

35

epítopo reconocido. Un epítopo lineal normalmente incluye al menos 3, o al menos 4 y, más generalmente, al menos 5, o al menos 6, o al menos 7, por ejemplo, de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 aminoácidos o más en una secuencia única. En el contexto de la presente invención, se prefiere que el epítopo GM-CSF sea un epítopo discontinuo. En caso de que el anticuerpo se una a ambos tramos de secuencia 23-27 y 65-77, el epítopo puede ser llamado "discontinuo". En la estructura secundaria de GM-CSF humano, los aminoácidos 15-35 están situados en la hélice A, mientras que los residuos correspondientes a las posiciones 65-77 forman parte de una estructura de bucle situada entre las hélices C y D. Un modelo tridimensional de plegado de la molécula revela una proximidad estérica cercana de estos sitios con respecto a los demás (véase también el documento WO 2006/111353). Tal y como se utiliza en el presente documento, la expresión "epítopo discontinuo" debe entenderse como al menos dos tramos de secuencia de aminoácidos no adyacentes dentro de una cadena de polipéptidos dada, en este caso GM-CSF maduros humanos y primates no humano, que están enlazados simultánea y específicamente por un anticuerpo. Según esta definición, dicha unión específica simultánea puede ser del polipéptido GM-CSF en forma lineal. En este caso, se puede imaginar el polipéptido GM-CSF maduro formando un bucle extendido, en una región de la cual las dos secuencias indicadas en negrita por encima se alinean, por ejemplo, más o menos en paralelo y en proximidad unas de otras. En este estado, están específica y simultáneamente unidas por el fragmento de anticuerpos. Según esta definición, la unión específica simultánea de los dos tramos secuenciales de GM-CSF maduro indicado anteriormente también puede adoptar la forma de una unión de anticuerpos a un epítopo conformacional. En este caso, GM-CSF maduro ya tiene formada su conformación terciaria como normalmente existe in vivo. En esta conformación terciaria, la cadena de polipéptido de GM-CSF madura se pliega de tal manera que se acercan los dos tramos de secuencia indicados anteriormente, por ejemplo en la superficie exterior de una región particular de GM-CSF maduro y plegado, donde luego son reconocidos en virtud de su conformación tridimensional en el contexto de las secuencias de polipéptidos circundantes.

En otra realización más preferida, el epítopo anterior o el epítopo discontinuo anterior de GM-CSF comprende además:

- aminoácidos 28-31 (LSRD), en cursiva en las secuencias anteriores de GM-CSF humano y primate no humano;
- aminoácidos 32-33 (TA), subrayados en las secuencias anteriores de GM-CSF humano y primate no humano; y/o
- aminoácidos 21-22 (EA), subrayados en las secuencias anteriores de GM-CSF humano y primate no humano.

Los anticuerpos anti-GM-CSF monoclonales humanos preferidos o sus fragmentos funcionales son los que se describen específicamente en el documento WO2006/111353 bajo las SEQ ID Nos: 1 a 48 y 52 a 56, que representan secuencias de aminoácidos de regiones determinantes de complementariedad de las cadenas pesadas y ligeras (CDR) 1-3, así como regiones variables de cadenas pesadas y ligeras y cadenas de longitud completa.

Especialmente preferidos son los anticuerpos anti-GM-CSF o sus fragmentos funcionales que comprenden una secuencia CDR1 de la región variable de cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 14, una secuencia CDR2 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 15 y una secuencia CDR3 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 1; o que comprende una secuencia CDR1 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 14, una secuencia CDR2 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 15 y una secuencia CDR3 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 2; o que comprende una secuencia CDR1 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 14, una secuencia CDR2 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 15 y una secuencia CDR3 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 3; o que comprende una secuencia CDR1 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 14, una secuencia CDR2 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 15 y una secuencia CDR3 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 4; o que comprende una secuencia CDR1 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 14, una secuencia CDR2 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 15 y una secuencia CDR3 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 5; o que comprende una secuencia CDR1 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 14, una secuencia CDR2 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 15 y una secuencia CDR3 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 6; o que comprende una secuencia CDR1 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 14, una secuencia CDR2 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 15 y una secuencia CDR3 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 7; o que comprende una secuencia CDR1 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 14, una secuencia CDR2 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 15 y una secuencia CDR3 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 8; o que comprende una secuencia CDR1 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 14, una secuencia CDR2 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 15 y una secuencia CDR3 de la región variable de la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO. 9; o que comprende una secuencia CDR1

cadena pesada una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO. 35 y también se describe en el documento WO 2006/111353.

Las moléculas de anticuerpos monoclonales humanos y/o los fragmentos funcionales de la invención son especialmente ventajosos como neutralizadores de la actividad de GM-CSF humano. Los anticuerpos o sus fragmentos funcionales de acuerdo con estas realizaciones especialmente preferidas son muy ventajosos por varias razones.

En primer lugar, reconocen el GM-CSF humano con alta especificidad. Es decir, de una mezcla de GM-CSF humano con otros factores estimulantes de colonias humanos, las moléculas de unión según estas realizaciones son altamente discriminantes para el GM-CSF humano, mientras que los otros factores estimulantes de colonias en el mismo ambiente no se reconocen. Esto significa que se espera que un anticuerpo o su fragmento funcional de acuerdo con estas realizaciones, cuando se administre a un ser humano, se una específicamente y neutralice sólo la diana deseada, mientras que otras dianas no deseadas no estarán ni unidas ni serán neutralizadas. En última instancia, esto conduce a un alto grado de previsibilidad con respecto al modo terapéutico de acción in vivo.

En segundo lugar, los aglutinantes de acuerdo con estas realizaciones se unen a GM-CSF de primates y humanos con afinidad apreciable. La "afinidad apreciable" incluye la unión con una afinidad de aproximadamente 10^{-6} M (KD) o más fuerte. Preferiblemente, la unión se considera apreciable (o alta o específica) cuando la afinidad de unión es de aproximadamente 10^{-12} a 10^{-8} M, 10^{-12} a 10^{-9} M, de 10^{-12} a 10^{-10} M, de 10^{-11} a 10^{-8} M, preferiblemente de aproximadamente 10^{-11} a 10^{-9} M. Por lo que un aglutinante de la invención tiene preferiblemente una K_D dentro de ese intervalo. Dado que se han observado valores de K_D de aproximadamente 4×10^{-9} M hasta tan bajos como aproximadamente $0,04 \times 10^{-9}$ M, este último correspondiente a unos 40 pM, para las moléculas de anticuerpos descritas en el presente documento, se prefiere que las moléculas de anticuerpos de la invención tengan una K_D dentro de ese intervalo. Sin embargo, también se prefiere que las moléculas de anticuerpos de la invención tengan una K_D como se describe anteriormente. Dado que la constante cinética de asociación de tales moléculas en medios acuosos está controlada en gran medida por la difusión y, por lo tanto, no se puede mejorar más allá de lo que las condiciones de difusión locales permitirán en condiciones fisiológicas, la baja K_D surge principalmente como resultado de la constante cinética de disociación, k_{off} , que para el aglutinante de anticuerpos de afinidad más alta es de aproximadamente 10^{-5} s⁻¹. Esto significa que, una vez que se forma el complejo entre un anticuerpo monoclonal humano o su fragmento funcional de acuerdo con cualquiera de estas realizaciones por un lado y GM-CSF por otro lado, este no se separa fácilmente o, al menos, no se separa rápidamente. Para las moléculas de unión destinadas a ser neutralizadores de la actividad biológica, estas características son altamente ventajosas ya que el efecto neutralizador deseable normalmente durará sólo mientras la molécula, cuya actividad biológica debe ser neutralizada (en este caso GM-CSF primate y humano) sigue unida por la molécula de unión neutralizadora. Por lo tanto, una molécula neutralizadora que permanece unida a su diana prevista durante mucho tiempo continuará neutralizándose durante un largo tiempo consecuentemente.

La alta afinidad de unión de anticuerpos o sus fragmentos funcionales a GM-CSF de primates y humanos tiene una ventaja adicional. Normalmente, los anticuerpos o sus fragmentos funcionales serán eliminados del torrente sanguíneo de un paciente de una manera dependiente del tamaño, con moléculas más pequeñas que se excretan y eliminan antes que las más grandes. Dado que el complejo de los dos polipéptidos (fragmento de anticuerpos o anticuerpos y GM-CSF enlazado) es obviamente más grande que el anticuerpo solo, la baja k_{off} mencionada anteriormente tiene el efecto de que el neutralizador terapéutico se excreta y elimina del cuerpo del paciente más lentamente de lo que sería el caso, si no estuviera unido a GM-CSF. Por lo tanto, no sólo se incrementa la magnitud de la actividad neutralizadora, sino también su duración in vivo.

La actividad neutralizadora determinada para aglutinantes de acuerdo con las realizaciones anteriores es sorprendentemente alta. Como se describirá con más detalle a continuación, la actividad neutralizadora de GM-CSF se midió in vitro utilizando un ensayo de inhibición del crecimiento TF-1 (Kitamura, T. et al. (1989). J. Cell Physiol. 140, 323-34). Como una indicación del potencial neutralizador, se midieron los valores de IC_{50} , IC_{50} que representa la concentración del anticuerpo o su fragmento funcional de acuerdo con cualquiera de estas realizaciones necesarias para provocar una inhibición media máxima de la proliferación celular de TF-1. Para los anticuerpos anti-GM-CSF monoclonales humanos o sus fragmentos funcionales especificados se determinó por encima de un valor IC_{50} de aproximadamente 3×10^{-10} M, o aproximadamente 0,3 nM. Por lo tanto, las moléculas de unión son neutralizadores muy potentes de la actividad de GM-CSF humanos.

Otros ejemplos de anticuerpos anti-GM-CSF neutralizantes son el anticuerpo humano E10 y el anticuerpo G9 humano descrito en Li et al., (2006) PNAS 103(10):3557-3562. E10 y G9 son anticuerpos de clase IgG. E10 tiene una afinidad de unión de 870 pM para GM-CSF y G9 tiene una afinidad de 14 pM para GM-CSF. Ambos anticuerpos son específicos para la unión a GM-CSF humano y muestran una fuerte actividad neutralizadora según se evalúa con un ensayo de proliferación de células TF-1. Otros ejemplos son los anticuerpos humanos anti-GM-CSF que se describen en el documento WO 2006/122797.

También se describen antagonistas de GM-CSF que incluyen anticuerpos frente a la cadena alfa o la cadena beta de los receptores GM-CSF. Un anticuerpo del receptor anti-GM-CSF descrito en este documento puede estar en cualquier forma de anticuerpo como se explicó anteriormente, por ejemplo, intacto, quimérico, monoclonal,

policlonal, fragmento de anticuerpo o derivado, cadena única, humanizado, ser humano, etc. En la técnica se conocen ejemplos de anticuerpos de los receptores anti-GM-CSF, por ejemplo, anticuerpos neutralizantes de alta afinidad (véase, por ejemplo, U.S. Pat. No. 5.747.032 y Nicola et al., Blood 82:15, 1724, 1993).

5 Ejemplos de anticuerpos anti-GM-CSF conocidos se proporcionan en los documentos WO2006/122797, WO2007/049472, WO2007/092939, WO2009/134805, WO2009/064399, WO2009/038760. Los anticuerpos contra el receptor GM-CSF se proporcionan en el documento WO2007/110631.

10 En resumen, los anticuerpos anti-GM-CSF o sus fragmentos funcionales exhiben un alto grado de discriminación para el antígeno deseado, unen este antígeno extremadamente fuerte y durante mucho tiempo y exhiben una actividad neutralizadora muy potente durante mucho tiempo mientras permanecen unidos. Al mismo tiempo, la larga persistencia del complejo aglutinante-antígeno ralentiza la eliminación de este aglutinante del cuerpo, alargando así la duración del efecto terapéutico deseado in vivo. Las mismas características preferiblemente también se aplican para los anticuerpos que reconocen el receptor GM-CSF, como se describió anteriormente.

15 La composición de la presente invención es preferiblemente una composición farmacéutica. De acuerdo con las presentes realizaciones, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a una composición para su administración a un paciente, preferiblemente un paciente humano. Las composiciones o formulaciones farmacéuticas están generalmente en una forma que permita que la actividad biológica del ingrediente activo sea eficaz y, por lo tanto, que pueda administrarse a un sujeto para un uso terapéutico como se describe en el presente documento. Por lo general, la composición farmacéutica comprende formulaciones adecuadas (es decir, farmacéuticamente aceptables) de vehículos, estabilizadores y/o excipientes. En una realización preferida, la
20 composición farmacéutica es una composición para la administración parenteral, transdérmica, intraluminal, intraarterial, intratecal y/o intranasal o para su inyección directa en tejido. En particular, se prevé que dicha composición se administre a un paciente mediante perfusión o inyección. La administración de las composiciones adecuadas puede efectuarse por diferentes vías, por ejemplo, por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. La composición de la presente invención puede comprender además un
25 vehículo farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son habituales en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite / agua, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, liposomas, etc. Las composiciones que comprenden estos vehículos pueden formularse mediante métodos convencionales conocidos.

30 De acuerdo con las presentes realizaciones, la expresión "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad del compuesto neutralizante de GM-CSF que es eficaz para el tratamiento de enfermedades asociadas con GM-CSF, como trastornos inflamatorios y autoinmunes.

35 Dosis preferidas y métodos preferidos de administración son tales que, después de la administración, el compuesto neutralizante de GM-CSF está presente en la sangre en dosis efectivas. El calendario de administración se puede ajustar observando las condiciones de la enfermedad y analizando los niveles séricos del compuesto neutralizante de GM-CSF en pruebas de laboratorio seguidas al extender el intervalo de administración, por ejemplo, de dos veces por semana o una vez por semana a una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, etc., o, alternativamente, reduciendo la administración correspondiente a intervalos.

40 Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto a una dosis adecuada. El régimen de dosificación será determinado por el médico asistente y por factores clínicos. Como es bien sabido en las artes médicas, las dosis para cada paciente dependen de muchos factores, incluyendo el volumen corporal del paciente, la superficie corporal, edad, el compuesto particular a administrar, sexo, tiempo y vía de administración, estado de salud general, y otros medicamentos que se administren simultáneamente.

45 Los preparativos para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas o no acuosas estériles, suspensiones y emulsiones. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como el aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables como el oleato etílico. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, cloruro de dextrosa y sodio, Ringer lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (como los basados en la dextrosa de Ringer), etc. También pueden estar
50 presentes conservantes y otros aditivos, como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, gases inertes, etc. Además, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención podría comprender vehículos proteínicos, como, por ejemplo, albúmina sérica o inmunoglobulina, preferiblemente de origen humano. Se prevé que la composición farmacéutica de conformidad con la invención pueda comprender, además de los compuestos descritos anteriormente, agentes biológicamente activos, en función del uso previsto de la composición
55 farmacéutica. Tales agentes pueden ser medicamentos que actúen sobre el sistema gastro-intestinal, medicamentos que actúen como agentes citostáticos, medicamentos para prevenir la hiperuricemia, medicamentos que inhiban las inmunoreacciones (por ejemplo, corticosteroides), medicamentos que modulen la respuesta inflamatoria, medicamentos que actúen sobre el sistema circulatorio y/o agentes, como las citoquinas, conocidos en la técnica.

5 Para analizar el efecto de un compuesto neutralizante de GM-CSF, por ejemplo en la artritis reumatoide (AR), se pueden seleccionar medidas de datos, por ejemplo, de farmacocinética, inmunogenicidad y el potencial de mejorar los signos clínicos y síntomas de la AR medidos según los criterios de la respuesta DAS28, ACR20/50/70 y/o EULAR, imágenes por RMN para la sinovitis y el edema óseo, así como los datos reportados por el paciente. ACR es una medida que resume la mejora en el número de articulaciones sensibles e hinchadas, la escala del dolor, la evaluación de la mejora de los pacientes y médicos y ciertos marcadores de laboratorio. ACR 20 describe el porcentaje de los participantes en el estudio que lograron una mejora del 20 por ciento en los signos y síntomas clínicos, por ejemplo, una mejora del 20 por ciento en el recuento de articulaciones sensibles o hinchadas, así como una mejora del 20 por ciento en otros tres criterios relevantes para la enfermedad.

10 Otro problema importante en el desarrollo de fármacos, tal como la composición farmacéutica de acuerdo con la invención, es la modulación predecible de las propiedades farmacocinéticas. Para este fin, se establece un perfil farmacocinético del medicamento problema, es decir, un perfil de los parámetros farmacocinéticos que afectan a la capacidad de un medicamento en particular en el tratamiento de una condición determinada. Los parámetros farmacocinéticos del fármaco que influyen en la capacidad de un medicamento para el tratamiento de una
15 determinada entidad de la enfermedad incluyen, entre otros: la semivida, el volumen de distribución, el metabolismo hepático de primer paso y el grado de unión al suero sanguíneo. La eficacia de un agente farmacológico determinado puede verse influida por cada uno de los parámetros mencionados anteriormente. La "semivida" significa el tiempo en que el 50% de un medicamento administrado se elimina a través de procesos biológicos, por ejemplo, metabolismo, excreción, etc. Por "metabolismo hepático de primer paso" se entiende la propensión de un fármaco a ser metabolizado en el primer contacto con el hígado, es decir, durante su primer paso a través del
20 hígado. "Volumen de distribución" significa el grado de retención de un medicamento en los distintos compartimentos del cuerpo, como, por ejemplo, espacios intracelulares y extracelulares, tejidos y órganos, etc. y la distribución del fármaco dentro de estos compartimentos. "Grado de unión al suero sanguíneo" significa la propensión de un medicamento a interactuar y unirse a las proteínas séricas de la sangre, como la albúmina, lo que conduce a una
25 reducción o pérdida de la actividad biológica del fármaco.

Los parámetros farmacocinéticos también incluyen biodisponibilidad, tiempo de demora (T_{lag}), T_{max} , tasas de absorción y/o C_{max} para una cantidad determinada de fármaco administrado. "Biodisponibilidad" significa la cantidad de un medicamento en el compartimento sanguíneo. "Tiempo de demora" significa el tiempo de retardo entre la administración del medicamento y su detección y su capacidad de medida en sangre o plasma. " T_{max} " es el
30 tiempo después del cual se alcanza la concentración máxima de sangre del fármaco, la absorción se define como el movimiento de un medicamento desde el sitio de administración en la circulación sistémica, y " C_{max} " es la concentración sanguínea máxima obtenida con un fármaco dado. El tiempo para alcanzar una concentración en sangre o tejido del fármaco que se requiere para su efecto biológico está influido por todos los parámetros.

El término "toxicidad", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a los efectos tóxicos de un medicamento manifestado en eventos adversos o eventos adversos graves. Estos eventos secundarios pueden referirse a una falta de capacidad de tolerar el fármaco en general y / o la falta de una tolerancia local después de la administración. La toxicidad también podría incluir efectos teratogénicos o cancerígenos causados por el fármaco.

Los términos "seguridad", "seguridad in vivo" o "capacidad de tolerar el fármaco", como se utiliza en este documento, definen la administración de un medicamento sin inducir eventos adversos graves directamente después de la
40 administración (tolerancia local) y durante un período más largo de aplicación del fármaco. La "seguridad", la "seguridad in vivo" o la "capacidad de tolerar el fármaco" pueden evaluarse, por ejemplo, a intervalos regulares durante el tratamiento y el período de seguimiento. Las mediciones incluyen la evaluación clínica, por ejemplo, manifestaciones de órganos, y el cribado de anomalías de laboratorio. La evaluación clínica puede llevarse a cabo y desviarse a los hallazgos normales registrados/codificados de acuerdo con las normas NCI-CTC y/o MedDRA. Las manifestaciones de órganos pueden incluir criterios como alergia/inmunología, sangre/médula ósea, arritmia cardíaca, coagulación y similares, como se establece, por ejemplo, en los Criterios Terminológicos Comunes para
45 Eventos Adversos v3.0 (CTCAE). Los parámetros de laboratorio que se pueden probar incluyen, por ejemplo, hematología, química clínica, perfil de coagulación y análisis de orina y examen de otros fluidos corporales como suero, plasma, líquido linfóide o cefalorraquídeo, exudados, etc. Por lo tanto, la seguridad puede evaluarse, por ejemplo, mediante un examen físico, técnicas de diagnóstico por imágenes (es decir, ultrasonido, rayos X, tomografías computarizadas, imágenes por resonancia magnética (RM), otras medidas con dispositivos técnicos (es decir, electrocardiogramas), signos vitales, midiendo los parámetros de laboratorio y registrando los eventos adversos. La expresión "dosis efectiva y no tóxica", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una
50 dosis tolerable del compuesto neutralizante de GM-CSF, preferiblemente el anticuerpo tal y como se define en el presente documento, que es lo suficientemente alto como para curar o estabilizar la enfermedad de interés sin provocar efectos tóxicos importantes, o esencialmente sin estos. Dichas dosis eficaces y no tóxicas pueden determinarse, por ejemplo, mediante estudios de aumento de la dosis descritos en la técnica y deben estar por debajo de la dosis que induce eventos secundarios adversos graves (toxicidad limitante de la dosis, DLT).

La formulación de la invención (a veces también conocida como "composición de la materia"; "composición", o
60 "solución") es una formulación líquida.

"Formulación líquida", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una composición de la materia que se encuentra como un líquido, caracterizado por el libre movimiento de las moléculas constituyentes entre sí, pero sin tendencia a separarse a temperatura ambiente. Las formulaciones líquidas de la invención incluyen a las formulaciones acuosas. Una formulación acuosa es una formulación en la que el disolvente o el disolvente principal es agua, preferiblemente agua para inyección (WFI). La disolución del compuesto neutralizante de GM-CSF en la formulación puede ser homogénea o heterogénea, siendo preferido que sea homogénea como se ha descrito anteriormente.

También se describen líquidos no acuosos que podrían emplearse siempre que proporcionen estabilidad a la formulación. El líquido no acuoso podría ser un líquido hidrófilo. Ejemplos ilustrativos de líquidos no acuosos adecuados incluyen: glicerol; dimetilsulfóxido (DMSO); polidimetilsiloxano (PMS); etilenglicoles, como el etilenglicol, dietilenglicol, trietilenglicol, polietilenglicol ("PEG") 200, PEG 300 y PEG 400; y propilenglicoles, como el dipropilenglicol, el tripropilenglicol, el polipropilenglicol ("PPG") 425 y el PPG 725.

"Formulación líquida acuosa/no acuosa mixta", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una formulación líquida que contiene una mezcla de agua, preferiblemente WFI, y una composición líquida adicional.

Cuando se utiliza en el presente documento, una "formulación" o una "composición" se entiende que es una mezcla de un compuesto neutralizante de GM-CSF (es decir, el fármaco/sustancia activa) y otras sustancias químicas y/o aditivos necesarios para un medicamento que se encuentra preferiblemente en estado líquido. Una formulación de la invención incluye una formulación farmacéutica.

La preparación de la formulación incluye el procedimiento en el que se combinan sustancias químicas diferentes, incluidas el fármaco activo, para producir un medicamento final, tal como una composición farmacéutica. El fármaco activo de la formulación de la invención es un compuesto neutralizador de GM-CSF.

En determinadas realizaciones, el compuesto neutralizante de GM-CSF que debe formularse es esencialmente puro y/o esencialmente homogéneo (es decir, está sustancialmente libre de sustancias contaminantes, por ejemplo, proteínas, etc., impurezas que puedan estar relacionadas con el producto y/o relacionadas con el proceso). La expresión "esencialmente puro" significa una composición que comprende al menos aproximadamente 80%, preferiblemente aproximadamente 90% o en peso del compuesto, preferiblemente al menos aproximadamente 95% en peso del compuesto, más preferiblemente al menos aproximadamente 97% en peso del compuesto o más preferiblemente al menos aproximadamente 98% en peso del compuesto, preferiblemente del compuesto en un estado monomérico. La expresión "esencialmente homogéneo" significa una composición que comprende al menos 99% en peso del compuesto, preferiblemente del compuesto en un estado monomérico, excluyendo la masa de diversos estabilizadores y agua en solución.

Cuando se utiliza en el presente documento, el término "aproximadamente" se entiende que puede haber variación en el valor o intervalo respectivo (como pH, concentración, porcentaje, molaridad, número de aminoácidos, tiempo, etc.) que puede ser de hasta 5%, hasta 10%, hasta 15% o hasta incluyendo 20% del valor dado. Por ejemplo, si una formulación comprende aproximadamente 5 mg/ml de un compuesto, esto se entiende que significa que una formulación puede tener entre 4 y 6 mg/ml, preferiblemente entre 4,25 y 5,75 mg/ml, más preferiblemente entre 4,5 y 5,5 mg/ml e incluso más preferiblemente entre 4,75 y 5,25 mg/ml, siendo el más preferido 5 mg/ml. Tal como se utiliza en el presente documento, un intervalo que se define como "(de) X a Y" equivale a un intervalo que se define como "entre X e Y". Ambos intervalos incluyen específicamente el límite superior y también el límite inferior. Esto significa que, por ejemplo, un intervalo de "5 mg/ml a 10 mg/ml" o "entre 5 mg/ml y 10 mg/ml" incluye una concentración de 5, 6, 7, 8, 9 y 10 mg/ml, así como cualquier valor intermedio dado.

Una formulación "estable" es una formulación en la que el compuesto neutralizante de GM-CSF conserva esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica en el almacenamiento y/o no muestra signos sustanciales de agregación, precipitación, fragmentación, degradación y/o desnaturalización en comparación con una muestra de control, preferiblemente tras un examen visual del color y/o claridad, o medida por la dispersión de la luz UV o por la cromatografía de exclusión por tamaños. Varias técnicas analíticas adicionales para medir la estabilidad de las proteínas están disponibles en la técnica y se revisan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 (1993), por ejemplo.

"Durante el almacenamiento", tal y como se utiliza en el presente documento, significa una formulación que, una vez preparada, no se utiliza inmediatamente; más bien, después de su preparación, se envasa para su almacenamiento, ya sea en forma líquida, en estado congelado, o en forma seca para su posterior reconstitución en una forma líquida u otra forma.

Se prevé que el compuesto neutralizante de GM-CSF sea preferiblemente estable en la medida en que no forme sustancialmente agregados o fragmentos / productos de degradación (por ejemplo, debido a una o más de las causas antes mencionadas) durante el almacenamiento y /o durante o después del estrés por congelar / descongelar y / o durante o después de la tensión de cizallamiento (por ejemplo, agitación). Por consiguiente, se prevé preferiblemente que no más del 10 % del compuesto neutralizante de GM-CSF, más preferiblemente no más

del 8%, incluso más preferiblemente no más del 5%, particular y preferiblemente no más de 2% en relación con la cantidad del compuesto neutralizante de GM-CSF al comienzo del almacenamiento o antes de llevar a cabo uno o más ciclos de congelación / descongelación o antes de llevar a cabo estudios de agitación forme agregados y / o fragmentos. Esta estabilidad se aplica preferentemente para un intervalo de tiempo de al menos 1 mes, al menos 2 meses o al menos 3 meses; preferiblemente 4 meses, al menos 5 meses o al menos 6 meses; más preferiblemente al menos 9 meses o al menos 12 meses; incluso más preferiblemente al menos 18 meses o al menos 24 meses; y la mayoría preferiblemente de al menos 30 meses o al menos 36 meses o al menos 48 meses o al menos 54 meses o al menos 60 meses. Las condiciones de temperatura de almacenamiento preferidas son hasta la temperatura ambiente (de aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C), más preferiblemente aproximadamente 2-8°C, el intervalo de tiempo preferido es de al menos 3 años o incluso al menos 4 años. El número de ciclos de congelación/descongelación durante los cuales el compuesto es preferiblemente estable de acuerdo con los parámetros anteriores es de al menos un ciclo, preferiblemente al menos 2, 3, o 4 ciclos, más preferiblemente al menos 5, 6 o 7 ciclos y, más preferiblemente, al menos 8, 9 o 10 ciclos. El número de días de agitación durante los cuales el compuesto es preferiblemente estable de acuerdo con los parámetros anteriores (por ejemplo, a una temperatura de +5°C ± 3°C, véase también el ejemplo 12d) es de al menos 1 día, preferiblemente al menos 2, 3, o 4 días, más preferiblemente al menos 5, 6 o 7 días, incluso más preferiblemente al menos 8, 9, 10 o 11 días y más preferiblemente, al menos, 12, 13 o 14 días.

Con carácter alternativo, se prevé que un compuesto neutralizante de GM-CSF sea preferiblemente estable en la medida en que no forme dímeros, oligómeros o sus fragmentos. Dicho de forma diferente, la estabilidad de un compuesto neutralizante de GM-CSF se puede determinar de acuerdo con el porcentaje de proteína monomérica en la solución, con un bajo porcentaje de proteína degradada (por ejemplo, fragmentada) y/o agregada. Por ejemplo, una formulación de la invención que comprende un compuesto neutralizante de GM-CSF, tal como un anticuerpo, puede incluir al menos un 90%, más preferiblemente al menos un 92%, aún más preferiblemente al menos un 95%, particularmente preferiblemente al menos un 98% y, más preferiblemente, al menos un 99% del monómero del compuesto neutralizante de GM-CSF.

Por "agregado" se entiende una interacción física entre moléculas de proteína que dan como resultado la formación de dímeros u oligómeros covalentes o no covalentes (es decir, entidades de alto peso molecular) que pueden permanecer solubles, o formar agregados insolubles que precipiten a partir de la solución. Un "agregado" también incluye una proteína degradada y/o fragmentada.

Como se mencionó anteriormente, se pueden utilizar una serie de métodos analíticos diferentes para detectar la presencia y los niveles de agregados en una formulación que comprenda un compuesto neutralizante de GM-CSF. Estos incluyen, entre otros, por ejemplo, electroforesis de gel de poli(acrilamida) natural (PAGE), electroforesis de gel de dodecil sulfato de sodio-poli(acrilamida) (SDS-PAGE), electroforesis de gel capilar (CGE), cromatografía de exclusión por tamaños (SEC), ultracentrifugación analítica (AUC), fraccionamiento de flujo de campo (FFF), detección de dispersión de luz, velocidad de sedimentación, espectroscopía UV, calorimetría diferencial de barrido, turbidimetría, nefelometría, microscopía, cromatografía de exclusión por tamaño-líquida de alta resolución (SE-HPLC), cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC), espectroscopía de masas en tándem de electroSPRAY ionización (ESI-MS) y tándem RP- HPLC/ESI-MS, técnica de fraccionamiento de flujo de campo y dispersión de luz estática y / o dinámica. Estos métodos se pueden utilizar solos o en combinación. Preferiblemente, los métodos analíticos para detectar la presencia y los niveles de agregados y/o fragmentos en una formulación que comprende un compuesto neutralizante de GM-CSF son la cromatografía de exclusión por tamaños como SE-HPLC, la ultracentrifugación analítica y el fraccionamiento de flujo de campo asimétrico. Un método para determinar la actividad biológica de un compuesto neutralizante de GM-CSF es, por ejemplo, la medición de su grado de unión a GM-CSF (o receptor GM-CSF) (inmovilizado) es la llamada resonancia plasmón de superficie (SPR).

Un problema común con las formulaciones que comprenden proteínas es la acumulación irreversible de agregados por modos de estrés temporales, térmicos o por cizallamiento. Normalmente, cuando los agregados precipitan, forman partículas grandes que son fáciles de detectar. Sin embargo, los agregados solubles más pequeños y no covalentes, que a menudo son precursores de la precipitación en partículas grandes, son más difíciles de detectar y cuantificar. Por lo tanto, los métodos para detectar y cuantificar la agregación de proteínas en una formulación proteica deben basarse en el tipo de agregado que se esté evaluando.

Entre los métodos anteriores, los métodos sugeridos para determinar la presencia y/o las cantidades de agregados solubles y covalentes en una formulación proteica son: SEC/dispersión luz, SDS-PAGE, CGE, RP-HPLC/ESI-MS, FFF y AUC: Los métodos sugeridos para determinar la presencia y/o cantidades de agregados solubles y no covalentes en una formulación proteica son: SEC, PAGE, SDS-PAGE, CGE, FFF, AUC y dispersión de luz dinámica. Los métodos sugeridos para determinar la presencia y/o cantidades de agregados insolubles y no covalentes en una formulación proteica son: espectroscopía UV, turbidimetría, nefelometría, microscopía, AUC, fraccionamiento de flujo de campo asimétrico y dispersión dinámica de la luz.

Además, la formulación de la invención proporciona preferiblemente un mejor almacenamiento a largo plazo de tal manera que el compuesto neutralizante de GM-CSF es estable en el transcurso del almacenamiento, ya sea en líquido o congelado, preferiblemente en forma líquida. Tal como se utiliza en el presente documento, se entiende que la frase almacenamiento "a largo plazo" significa que la formulación se puede almacenar durante al menos un

mes, dos o tres meses o más, durante seis meses o más y, preferiblemente, durante un año y más, o incluso 2 años, 3 años o 4 años o 5 años y más. El almacenamiento a largo plazo también se entiende como que la composición farmacéutica se almacena a 2-8°C o a temperatura ambiente, preferiblemente a 2-8°C, por lo que la formulación preferentemente no pierde su actividad biológica en la medida descrita en el presente documento y/o no forma agregados en la medida en que se describe en el presente documento y/o comprende monómeros en la medida descrita en el presente documento. Las pruebas para estas propiedades se describen en este documento en otra parte.

En un aspecto de la invención, el compuesto neutralizante de GM-CSF en las formulaciones es estable en forma líquida durante al menos 1 mes, 2 meses, 3 meses; al menos 4 meses, al menos 5 meses; al menos 6 meses; al menos 12 meses; al menos 24 meses; al menos 36 meses; al menos 48 meses, al menos 60 meses. Los intervalos intermedios a los períodos de tiempo citados anteriormente también están destinados a ser parte de esta invención, por ejemplo, 9 meses, etc. Además, los intervalos de valores que utilizan una combinación de cualquiera de los valores citados anteriormente como límites superior y/o inferior están pensados para ser incluidos. Preferiblemente, la formulación es estable a la temperatura ambiente (de aproximadamente 20°C a 25°C) durante al menos 1 mes y/o estable a aproximadamente 2-8°C durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses, o más preferiblemente estable a aproximadamente 2-8°C durante al menos 2 años, al menos 3 años, al menos 4 años o incluso al menos 5 años.

Otro aspecto importante de la estabilidad es que el compuesto neutralizante de GM-CSF dentro de la composición de acuerdo con la invención mantiene su actividad biológica o potencia durante el tiempo de almacenamiento y dentro de las condiciones de almacenamiento, especialmente de temperatura, y con los posibles cambios de temperatura. La actividad o potencia es, por ejemplo, reflejada por la propia capacidad neutralizadora del compuesto (que se puede medir en ensayos basados en células, como se describe en el presente documento anterior) o por la capacidad del compuesto neutralizante de GM-CSF para unirse a GM-CSF o al receptor de GM-CSF. La afinidad de unión puede ser evaluada por SPR u otros métodos habituales en la técnica, por ejemplo, un ensayo Biacore o Scatchard.

La formulación de la invención se prepara añadiendo a un compuesto neutralizante de GM-CSF como se describe en el presente documento, en una solución acuosa, un tampón y un modificador de la tonicidad. Las personas que tienen habilidad en la técnica entenderán que la combinación de los diversos componentes a incluir en la formulación se puede hacer en cualquier orden apropiado. Por ejemplo, el tampón se puede agregar primero, a la mitad o al final y el modificador de la tonicidad también se puede agregar primero, a la mitad o al final. También debe entenderse por los expertos en la técnica que algunos de estos productos químicos pueden ser incompatibles en ciertas combinaciones y que, en consecuencia, se sustituyen fácilmente por productos químicos diferentes que tienen propiedades similares pero que son compatibles en la mezcla pertinente.

La formulación de la invención comprende un tampón. El término "tampón" o "agente tampón", tal y como se utiliza en el presente documento, incluye a aquellos agentes que mantienen el pH en un intervalo deseado. Un tampón es una solución acuosa que consiste en una mezcla de un ácido débil y su base conjugada, o una base débil y su ácido conjugado. Tiene la propiedad de que el pH de la solución cambia muy poco cuando se añade una pequeña cantidad de ácido fuerte o base. Las soluciones tampón se utilizan como un medio para mantener el pH a un valor casi constante en una amplia variedad de aplicaciones químicas. En general, un tampón, cuando se aplica en la formulación de la invención, estabiliza preferentemente el compuesto neutralizante de GM-CSF.

Los "tampones de aminoácidos", cuando se utilizan en este documento, incluyen, por ejemplo, bases de aminoácidos, por ejemplo, la histidina y su sal conjugada. Un ejemplo de un tampón de aminoácido es el cloruro de histidina o la propia histidina. Este ejemplo se aplica preferentemente a la invención.

El pH preferido de una formulación, como se describe en el presente documento, puede elegirse entre los siguientes intervalos: de aproximadamente 4 a aproximadamente 10, preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, más preferiblemente de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. El pH de la formulación de la presente invención es de aproximadamente, o exactamente, 5,8. En consecuencia, se utiliza preferentemente un tampón que puede mantener una solución a pH 5 a 7. El término "aproximadamente", cuando se utiliza en el contexto del valor/intervalo de pH, preferiblemente significa un valor numérico que tiene un intervalo de +/- 20% aproximadamente el valor citado. Cuando el pH de la composición farmacéutica se establece a niveles fisiológicos o cerca de estos, se maximiza la comodidad del paciente tras la administración. Debe entenderse que el pH puede ajustarse según sea necesario para maximizar la estabilidad y la solubilidad del compuesto neutralizante de GM-CSF en una formulación particular y, como tal, un pH fuera de los intervalos fisiológicos, aunque deba ser preferiblemente tolerable para el paciente, estará dentro del alcance de la invención.

En la presente invención, el tampón comprende a la histidina. Ejemplos no limitantes de otros tampones que pueden utilizarse en una formulación descrita en este documento incluyen succinato, gluconato, citrato, arginina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, tris (trometamol), Bis-Tris, MOPS, ACES, TES, HEPES, EPPS, etilendiamina, ácido fosfórico, ácido maleico/ fosfato, ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES), fosfato, acetato y dietanolamina.

En la formulación de la invención se aplica un tampón de histidina en la formulación de la invención, preferiblemente entre pH 5 y 7, más preferiblemente entre pH 5,5 y 6,5, aún más preferiblemente a pH 5,8. Los tampones aplicados en la invención son habituales en la técnica y son fabricados por métodos conocidos y disponibles a partir de proveedores comerciales.

- 5 La formulación puede comprender además hidróxido de sodio (NaOH). En realizaciones particulares, la formulación comprende 1-200 mM, o menos de 50 mM, menos de 40 mM, menos de 35 mM, menos de 30 mM, menos de 25 mM, menos de 20 mM, o menos de 15 mM, por ejemplo, 10 mM de NaOH o menos, tal y como 5 mM o 1 mM de hidróxido de sodio.

- 10 Además del compuesto neutralizante de GM-CSF y el tampón, la formulación de acuerdo con la invención también puede contener otras sustancias que incluyan, entre otros, agentes estabilizadores.

- Además, la formulación de la invención comprende un estabilizador que también puede actuar como un modificador de la tonicidad. La expresión "agente estabilizador" se refiere a un agente que mejora o potencia de otro modo la estabilidad de la formulación, en particular de los compuestos neutralizantes de GM-CSF. Un agente estabilizador, que es un modificador de la tonicidad, se define como un azúcar no reductor, un alcohol de azúcar o una combinación de los mismos. Los modificadores de la tonicidad en las composiciones líquidas aseguran que la tonicidad, es decir, la osmolaridad, de la solución sea esencialmente la misma que la de los fluidos fisiológicos normales y que, así, prevenga la hinchazón posterior a la administración o la rápida absorción de la composición debida a las concentraciones de iones diferenciales entre la composición y los fluidos fisiológicos. Generalmente, la naturaleza de la formulación, tal y como se describe en el presente documento, es tal que la osmolalidad de la formulación está entre aproximadamente 240 y aproximadamente 470 mOsmol/kg, más preferiblemente, entre aproximadamente 300 y aproximadamente 400 mOsmol/kg, más preferiblemente aproximadamente 350 mOsmol/kg.

- Se describe un agente estabilizador/modificador de la tonicidad que puede ser uno o más entre azúcares no reductores, como la sacarosa o la trehalosa o uno o más alcoholes de azúcar, como el manitol o el sorbitol, también combinaciones de azúcares no reductores y alcoholes de azúcar. En la presente invención, la concentración del agente estabilizador/modificador de la tonicidad en la composición es de aproximadamente 5% (p/v). El estabilizador/modificador de la tonicidad aplicado en la formulación de la invención es el sorbitol, al 5% (p/v).

- En una realización preferida, la formulación descrita en el presente documento no comprende más excipientes, como aminoácidos (excepto cuando el tampón se elija de un tampón aminoácido, tal como un tampón de histidina) o tensioactivos.

- 30 En las realizaciones menos preferidas, la formulación descrita en este documento comprende otros excipientes. Preferiblemente el excipiente se selecciona del grupo que consiste en un aminoácido, un crioprotector, un lioprotector, un tensioactivo, un agente de carga, un antioxidante y sus combinaciones.

- Los excipientes, también conocidos como aditivos químicos, co-solutos o co-disolventes, que estabilizan preferentemente los compuestos neutralizantes de GM-CSF mientras están en solución (también en formas secas o congeladas) pueden añadirse a una formulación de la presente descripción. Preferiblemente, los excipientes contribuyen a la estabilidad de los compuestos neutralizantes de GM-CSF, pero debe entenderse que los excipientes pueden contribuir de otra manera a las propiedades físicas, químicas y biológicas de la formulación. Los excipientes son habituales en la técnica y son fabricados por métodos conocidos y disponibles de proveedores comerciales.

- 40 Ejemplos de excipientes incluyen entre otros azúcares / polioles tales como: sacarosa, lactosa, glicerol, xilitol, sorbitol, manitol, maltosa, inositol, trehalosa, glucosa; polímeros tales como: albúmina sérica (albúmina sérica bovina (BSA), SA humana o HA recombinante), dextrano, PVA, hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), polietilenimina, gelatina, polivinilpirrolidona (PVP), hidroxietilcelulosa (HEC), hidroxietilalmidón (HES); disolventes no acuosos tales como: alcoholes polihídricos (por ejemplo, PEG, etilenglicol y glicerol), dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF); aminoácidos tales como: treonina, serina, prolina, alanina, valina, glutamina, metionina, cisteína, isoleucina, ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, glicina, histidina, lisina, fenilalanina, leucina, asparagina, triptófano y tirosina; tensioactivos tales como: Tween-80, Tween-20, SDS, polisorbato, copolímero de polioxietileno; y varios excipientes como: fosfato de potasio, acetato de sodio, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, sulfato de sodio, trimetilamina N-óxido, betaína, iones metálicos (por ejemplo, zinc, cobre, calcio, manganeso, y magnesio), CHAPS, monolaurato, 2-O-beta-mannoglicerato o cualquier combinación de lo anterior.

- Los "agentes crioprotectores" incluyen sustancias que proporcionan estabilidad a la proteína congelada durante la producción, congelación, almacenamiento, manipulación, distribución, reconstitución o uso. En un aspecto particular, los "crioprotectores" incluyen sustancias que protegen a la proteína de las tensiones inducidas por el proceso de congelación. Los crioprotectores pueden tener efectos lioprotectores. Ejemplos no limitadores de crioprotectores incluyen azúcares, como sacarosa, glucosa, trehalosa, manitol, sorbitol, manosa y lactosa; polímeros, como el dextrano, el almidón de hidroxietilo, la polivinilpirrolidona (PVP) y el polietilenglicol; tensioactivos, como los polisorbatos (por ejemplo, PS-20 o PS-80); y aminoácidos, como glicina, arginina, leucina y serina. Generalmente, se utiliza un crioprotector que presenta baja toxicidad en los sistemas biológicos.

Un disacárido, tal y como se describe en el presente documento, puede actuar como un lioprotector o crioprotector. Los "lioprotectores" incluyen sustancias que previenen o reducen la inestabilidad química o física de una proteína frente a la liofilización y su almacenamiento posterior. En un aspecto, el lioprotector previene o reduce las inestabilidades químicas o físicas en la proteína a medida que el agua se pierde en la composición durante el proceso de secado. En otro aspecto, el lioprotector estabiliza la proteína ayudando a mantener la conformación adecuada de la proteína a través de puentes de hidrógeno.

En consecuencia, en un aspecto, un disacárido, como se describe en el presente documento, puede servir para estabilizar los compuestos neutralizantes de GM-CSF durante la congelación. Dado que la protección durante la congelación puede depender de la concentración absoluta del disacárido (Carpenter et al., Pharm. Res. (1997), 14:969-975), pueden ser necesarias concentraciones superiores al 5% para maximizar la estabilidad.

Se puede añadir un lioprotector a la formulación descrita en este documento. El término "lioprotector", tal y como se utiliza en el presente documento, incluye agentes que proporcionan estabilidad a la proteína durante el proceso de liofilización o deshidratación (ciclos primarios y secundarios de liofilización), proporcionando una matriz vídriosa amorfa y uniéndose con la proteína a través de puentes de hidrógeno, reemplazando las moléculas de agua que se eliminan durante el proceso de secado. Esto ayuda a mantener la conformación de proteína, minimizar la degradación de las proteínas durante el ciclo de liofilización, y mejorar la estabilidad del producto a largo plazo. El lioprotector se añade a la formulación previamente liofilizada en una "cantidad lioprotectora" lo que significa que, después de la liofilización de los compuestos neutralizantes de GM-CSF en presencia de la cantidad lioprotectora del lioprotector, los compuestos esencialmente conservan su estabilidad física y química e integridad bajo la liofilización y el almacenamiento.

Ejemplos no limitantes de lioprotectores incluyen azúcares, como la sacarosa o la trehalosa; un aminoácido, como el glutamato monosódico, la glicina o la histidina; una metilamina, como la betaína; una sal liotrópica, como el sulfato de magnesio; un poliol, como alcoholes de azúcar trihídricos o superiores, por ejemplo, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol; polietilenglicol; pluronics; y sus combinaciones. Preferiblemente, los lioprotectores son como se describió anteriormente para los agentes estabilizadores. La cantidad de lioprotector añadido a la formulación es generalmente una cantidad que no conduce a un grado inaceptable de degradación/agregación de la proteína cuando la formulación de proteínas se liofiliza.

Otro excipiente es un tensioactivo. El término "tensioactivo" generalmente incluye aquellos agentes que protegen los compuestos neutralizantes de GM-CSF de las tensiones inducidas por la interfaz aire/solución y las tensiones inducidas por la solución/superficie. Por ejemplo, los tensioactivos pueden proteger la proteína de la agregación.

Ejemplos de tensioactivos incluyen, entre otros, tensioactivos no iónicos, como los polisorbatos (por ejemplo, polisorbato 80 o polisorbato 20); poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188); Tritón, dodecilsulfato de sódico (SDS); lauril-sulfato de sodio; octil-glucósido de sodio; lauril-sulfobetaína, miristil-sulfobetaína, linoleil-sulfobetaína, estearil-sulfobetaína, lauril-sarcosina, miristil-sarcosina, linoleil-sarcosina, estearil-sarcosina, linoleil-betaína, miristil-betaína, cetil-betaína, lauroamidopropil-betaína, cocamidopropil-betaína, linoleamidopropil-betaína, miristamidopropil-betaína, palmidopropil-betaína, isoestearamidopropil-betaína (por ejemplo, lauroamidopropilo), miristamidopropil-, palmidopropil-, o isoestearamidopropil-dimetilamina; metil cocoilo sódico, o metil ofeil-taurato de disodio; y la serie Monaquat (Mona Industries, Inc., Paterson, NJ.), polietilglicol, polipropilglicol y copolímeros de etileno y propilenglicol (por ejemplo, pluronics, PF68). La cantidad de tensioactivo añadido es tal que mantiene la agregación de la proteína a un nivel aceptable como se analiza utilizando, por ejemplo, SEC-HPLC, o mediciones de oscurecimiento de la luz para determinar el porcentaje de especies de alto peso molecular (HMW) o especies de bajo peso molecular (LMW), y minimiza la formación de partículas de la formulación de proteínas descrita en este documento.

El agente de carga también puede ser un excipiente. La expresión "agente de carga", tal y como se utiliza en el presente documento, incluye agentes que proporcionan la estructura de un producto liofilizado sin interactuar directamente con el producto farmacéutico. Además de proporcionar una torta farmacéuticamente elegante, los agentes de carga también pueden impartir cualidades útiles con respecto a la modificación de la temperatura del colapso, proporcionar protección contra los procesos de congelación y descongelación, y mejorar la estabilidad de las proteínas en el almacenamiento a largo plazo. Ejemplos no limitantes de agentes de carga incluyen manitol, glicina, lactosa y sacarosa. Los agentes de carga pueden ser cristalinos (como la glicina, el manitol o el cloruro de sodio) o amorfos (como el dextrano, el almidón de hidroxietilo) y, generalmente, se utilizan en formulaciones proteicas en una cantidad de 0,5 a 10%.

Preferiblemente, el agente de carga aplicado en la formulación puede promover la formación de una torta que sea estéticamente aceptable, uniforme o mecánicamente fuerte. Los agentes de carga también promueven preferentemente la formación de una estructura de poros abiertos y facilidad y velocidad en la reconstitución. Los agentes de carga también reducen o previenen preferiblemente el colapso de la torta, el derretimiento eutéctico o la retención de humedad residual. En otro aspecto, los agentes de carga ayudan preferentemente a proteger los compuestos neutralizantes de GM-CSF contra tensiones (por ejemplo, tensiones físicas y químicas) y ayudan a mantener la actividad proteica.

Un antioxidante también puede ser un excipiente. Como se utiliza en el presente documento, un "antioxidante" es una molécula capaz de ralentizar o prevenir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es una reacción química que transfiere electrones de una sustancia a un agente oxidante. Para su uso en la composición, los antioxidantes fisiológicamente aceptables son de interés. Tales antioxidantes incluyen, sin limitación, agentes reductores, ácido ascórbico (vitamina C), ácido lipoico, melatonina, ácido úrico, carotenos, retinoides, tocoferoles y tocotrienoles, por ejemplo, α -tocoferol (vitamina E), ubiquinona (coenzima Q), etc.

La formulación puede contener opcionalmente un conservante. Un "conservante" es un compuesto que se puede añadir a las formulaciones en este caso para reducir la actividad bacteriana. La adición de un conservante puede, por ejemplo, facilitar la producción de una formulación multiuso (dosis múltiples). Ejemplos de posibles conservantes incluyen cloruro de octadecildimetilbencil-amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio, en el que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga), y cloruro de benzetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos como alcoholes de fenol, butilo y bencílico, alquil-parabenos como el metil- o propil-parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol, y m-cresol. El conservante más preferido en este documento es el alcohol bencílico.

En consecuencia, la formulación de la presente invención es una formulación líquida, específicamente acuosa, para el almacenamiento a largo plazo que comprende entre aproximadamente 100 mg/ml y 200 mg/ml de un compuesto neutralizante de GM-CSF y un tampón de histidina, a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, y la formulación comprende además sorbitol como estabilizador/modificador de la tonicidad.

En realizaciones particularmente preferidas, una formulación de la invención es una formulación líquida, específicamente acuosa, para un almacenamiento a largo plazo que comprende entre aproximadamente 100 mg/ml y 200 mg/ml de un compuesto neutralizante de GM-CSF, más preferiblemente aproximadamente 150 mg/ml, y un tampón de histidina a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM, específicamente aproximadamente 30 mM, a un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, específicamente 5,8, y la formulación comprende además de aproximadamente un 4% a aproximadamente el 6%, específicamente aproximadamente 5% (p/v) de sorbitol y, opcionalmente, sin excipientes adicionales como tensioactivos, aminoácidos y/o NaCl.

Es de entender que ciertos componentes de la composición puedan intercambiarse con alternativas conocidas en la técnica. Sin embargo, los expertos en la técnica también entenderán que la inclusión de ciertos componentes impedirá el uso de otros componentes, concentraciones o métodos de preparación de la formulación, por razones que incluyen, entre otras, la compatibilidad química, el pH, la tonicidad y la estabilidad.

Es beneficioso para la formulación líquida de la invención presentar una viscosidad baja y factible que sea adecuada para la administración subcutánea, como en un dispositivo listo para usar. La viscosidad de la formulación de acuerdo con la invención es, por lo tanto, preferiblemente inferior a 20 mPa*s a una velocidad de cizallamiento entre aproximadamente 50 y aproximadamente 1000 [1/s] y a una temperatura de unos 20°C. Más preferiblemente, la viscosidad es inferior a 15 mPa*s en las condiciones anteriores.

Como se menciona en el presente documento, esta aplicación generalmente se relaciona con el descubrimiento de que la adición de varias sustancias a una formulación que comprende los compuestos neutralizadores de GM-CSF puede reducir la agregación y/o degradación/fragmentación de estos compuestos en una formulación. Independientemente de lo que hace que un compuesto neutralizante de GM-CSF en una formulación se acuse o se degrade, la adición de las sustancias como se describe en el presente documento reduce la agregación / fragmentación de los compuestos neutralizantes de GM-CSF en la formulación. En ciertas realizaciones, la adición de una sustancia descrita reduce la agregación / degradación en una formulación causada, por ejemplo, por el almacenamiento, la exposición a temperaturas elevadas, la exposición a la luz, la exposición a la tensión por cizallamiento, la presencia de tensioactivos, condiciones iónicas y de pH, y cualquier combinación de los mismos.

Las medidas encontradas por los presentes inventores pueden utilizarse para disminuir la agregación y/o degradación/fragmentación de los compuestos neutralizantes de GM-CSF formulados, en particular, en forma líquida y congelada. Por lo tanto, la agregación/fragmentación reducida se observa preferentemente en una formulación líquida. Se supone que también se puede observar una agregación/degradación reducida cuando se almacena directamente en forma líquida para su uso posterior, se almacena en estado congelado y se descongela antes de su uso, o se prepara en forma seca, como una forma liofilizada, secada al aire o secada por pulverización, para su posterior reconstitución en una forma líquida u otra forma antes de su uso.

Por lo tanto, se prevé que la formulación descrita en el presente documento pueda ser almacenada por cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Ejemplos no limitantes incluyen enfriamiento, congelación, liofilización y secado por pulverización de la formulación, prefiriéndose el almacenamiento por enfriamiento.

En algunos casos, las formulaciones proteicas se congelan para su almacenamiento. En consecuencia, es deseable que la formulación sea relativamente estable en tales condiciones, incluidos los ciclos de congelación-descongelación. Un método para determinar esta idoneidad de una formulación consiste en someter a una muestra de la formulación a al menos una, por ejemplo, una, tres, cinco, siete y hasta diez ciclos de congelación y

descongelación (por ejemplo, una congelación a aproximadamente $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ durante la noche y descongelación rápida a temperatura ambiente o descongelación lenta en hielo, por ejemplo, durante 6 horas), determinando la cantidad de especies de bajo peso molecular (LMW) y/o especies de alto peso molecular (HMW) que se acumulan después de los ciclos de congelación-descongelación y comparándola con la cantidad de especies de LMW o especies de HMW presentes en la muestra antes del procedimiento de congelación y descongelación. Un aumento en las especies de LMW o HMW indica una disminución de la estabilidad de una proteína almacenada como parte de la formulación. La cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaños (SE-HPLC) se puede utilizar para determinar la presencia de especies de LMW y HMW.

Preferiblemente, las formulaciones proteicas pueden almacenarse como un líquido. En consecuencia, como se describe en el presente documento, es deseable que la formulación líquida sea estable en tales condiciones, incluso a varias temperaturas. Por ejemplo, un método para determinar la idoneidad de una formulación consiste en almacenar la formulación de la muestra a varias temperaturas (como $2-8^{\circ}\text{C}$, 15°C , 20°C , 25°C , 30°C , 35°C , 40°C y 50°C) y monitorizando la cantidad de especies de HMW y/o LMW que se acumulan con el tiempo. Cuanto menores sean las cantidades de especies de HMW y/o LMW que se acumulen con el tiempo, mejor será la condición de almacenamiento de la formulación. Además, el perfil de carga de la proteína puede ser monitoreado por cromatografía líquida de alta resolución (CEX-HPLC) de intercambio catiónico. Alternativamente, las formulaciones se pueden almacenar después de la liofilización. Además, es deseable que la formulación sea estable en las condiciones de tensión por cizallamiento. Un método para determinar la idoneidad de la formulación consiste en agitar la formulación en un agitador, por ejemplo, un agitador vertical, a la temperatura deseada (como $2-8^{\circ}\text{C}$, 15°C , 20°C , 25°C , 30°C , 35°C , 40°C y 50°C , preferiblemente $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$). El receptor (por ejemplo, un vial) se puede almacenar en un agitador durante un período de tiempo deseado, por ejemplo, hasta 14 días o más, frente a un control que se almacena sin agitar a la misma temperatura. La recopilación de puntos de datos se puede llevar a cabo, por ejemplo, después de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 y 14 días. La cantidad de especies de bajo peso molecular (LMW) y/o especies de alto peso molecular (HMW) que se acumulan después del almacenamiento de agitación se puede determinar y comparar con la cantidad de especies de LMW o especies de HMW presentes en la muestra no agitada. Un aumento en las especies de LMW o HMW indica una disminución de la estabilidad de una proteína almacenada como parte de la formulación. La cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaños (SE-HPLC) se puede utilizar para determinar la presencia de especies de LMW y HMW.

En algunos casos, la formulación se seca por pulverización y, luego, se almacena. Para el secado por pulverización, se pulveriza una formulación líquida en presencia de una corriente de gas seco. El agua se elimina de las gotas de formulación en la corriente de gas, lo que da como resultado partículas secas de la formulación farmacéutica. Los excipientes pueden incluirse en la formulación para (i) proteger la proteína durante la deshidratación por secado por pulverización, (ii) proteger la proteína durante el almacenamiento después del secado por pulverización, y/o (iii) dar a la solución propiedades adecuadas para la aerosolización. El método es similar al descrito anteriormente para la congelación, excepto que la formulación de la muestra se seca por pulverización en lugar de congelarse, se reconstituye en un diluyente, y la formulación reconstituida se prueba para detectar la presencia de especies de LMW y/o especies de HMW. Un aumento de las especies de LMW o HMW en la muestra secada por pulverización en comparación con una formulación de muestra correspondiente que no fue liofilizada indica una disminución de la estabilidad en la muestra secada por pulverización.

El término "liofilizado" incluye un estado de una sustancia que ha sido sometida a un procedimiento de secado como la liofilización, donde al menos el 90% preferiblemente 95%, más preferiblemente el 98% de la humedad se ha eliminado. En consecuencia, el término "liofilización", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un procedimiento por el cual el material a secar se congela primero seguido de la eliminación del hielo o del disolvente congelado por sublimación en un entorno al vacío. Un excipiente (por ejemplo, el lioprotector) puede incluirse en las formulaciones que deben ser liofilizadas con el fin de mejorar la estabilidad del producto liofilizado en el momento del almacenamiento. La expresión "formulación reconstituida", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una formulación que ha sido preparada disolviendo una formulación de proteína liofilizada en un diluyente de tal manera que el compuesto neutralizante de GM-CSF se dispersa en el diluyente.

El término "diluyente", tal y como se utiliza en el presente documento, es una sustancia que es farmacéuticamente aceptable (segura y no tóxica para su administración a un ser humano) y que es útil para la preparación de una formulación líquida, como una formulación reconstituida después de la liofilización. Ejemplos no limitantes de diluyentes incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWHI), una solución de pH tamponada (por ejemplo, una solución salina de fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer, solución de dextrosa o soluciones acuosas de sales y/o tampones.

En otro aspecto de la invención, la formulación se diseña para su uso en terapias. En consecuencia, la invención prevé una composición farmacéutica (o medicamento) que comprende la formulación descrita en el presente documento.

En otra realización más, la invención proporciona un método de tratamiento a un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación descrita en el presente documento, en la que el sujeto tiene una enfermedad o trastorno que puede ser tratado beneficiosamente con un compuesto neutralizante de GM-CSF.

Preferiblemente, la formulación descrita en el presente documento se aplica en la profilaxis y/o el tratamiento de una enfermedad que puede prevenirse y/o tratarse y/o mejorarse con compuestos neutralizantes de GM-CSF.

El término "sujeto" pretende incluir organismos vivos. Ejemplos de sujetos incluyen mamíferos, por ejemplo, humanos, perros, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos, ratas y animales transgénicos no humanos. En las realizaciones preferidas de la invención, el sujeto es un ser humano.

La expresión "dosis efectiva" o "dosificación efectiva" se define como una cantidad suficiente para lograr o, al menos parcialmente, lograr el efecto deseado. La expresión "dosis terapéuticamente efectiva" se define como una cantidad suficiente para curar o, al menos parcialmente, detener la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya ha padecido la enfermedad. Las cantidades efectivas para este uso dependerán de la gravedad de la condición médica y del estado general del propio sistema inmunológico del sujeto. El término "paciente" incluye sujetos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico.

La dosis adecuada, o cantidad terapéuticamente eficaz, de la formulación dependerá de la condición a tratar, la gravedad de la condición antes del tratamiento, y la historia clínica del paciente y la respuesta al agente terapéutico. La dosis adecuada se puede ajustar de acuerdo con el criterio del médico asistente de tal manera que se puede administrar al paciente una vez o en una serie de administraciones. La composición farmacéutica se puede administrar como un único agente terapéutico o en combinación con terapias adicionales según sea necesario.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención son particularmente útiles para la administración parenteral, es decir, por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular y/o intrasnovial, en la que se prefiere la administración subcutánea. La administración parenteral se puede llevar a cabo mediante inyección de bolo o perfusión continua.

Las composiciones farmacéuticas inyectables pueden presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con otro conservante. Además, se han desarrollado varios enfoques recientes de administración de medicamentos y las composiciones farmacéuticas de la presente invención son adecuadas para la administración utilizando estos nuevos métodos, por ejemplo, Inject-ease, Genject, lápices inyectoros como Genen, y dispositivos sin aguja como MediJector y BioJector. La presente composición farmacéutica también se puede adaptar para los métodos de administración aún por descubrir. Véase también Langer, 1990, Science, 249: 1527-1533.

Las composiciones farmacéuticas liofilizadas pueden presentarse preferentemente en un vial que contenga el ingrediente activo. En una realización, las composiciones farmacéuticas comprenden además una solución para la reconstrucción.

La composición farmacéutica puede comprender además otros componentes farmacéuticamente aceptables. Otros vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables, como los descritos en la 16a edición del manual Remington Pharmaceutical Sciences, Osol, A. Ed. (1980), también pueden incluirse en una formulación proteica como la descrita en el presente documento, siempre que no afecte negativamente a las características deseadas de la formulación. Tal y como se utiliza en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es habitual en la técnica. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas e incluyen: modificadores de la tonicidad; agentes tamponantes adicionales; conservantes; co-disolventes; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes como el EDTA; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); polímeros biodegradables, como los poliésteres; contraiones formadores de sal, como alcoholes de sodio, de azúcar polihídricos; aminoácidos, como alanina, glicina, asparagina, 2-fenilalanina, y treonina; azúcares o alcoholes de azúcar, como lactitol, estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, ribitol, mioininitosa, mioininitol, galactosa, galactitol, glicerol, ciclitoles (por ejemplo, inositol), polietilglicol; agentes reductores que contienen azufre, como glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, [alfa]-monotioglicerol y tio-sulfato de sodio; proteínas de bajo peso molecular, como albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina, gelatina u otras inmunoglobulinas; y polímeros hidrófilos, como la polivinilpirrolidona.

Las formulaciones descritas en este documento son útiles como composiciones farmacéuticas en el tratamiento y/o prevención y/o mejora de una enfermedad, o trastorno en un paciente necesitado de las mismas. El término "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. El tratamiento incluye la aplicación o administración de la formulación al cuerpo, un tejido aislado o una célula de un paciente que tenga una enfermedad/trastorno, un síntoma de una enfermedad/trastorno, o una predisposición hacia una enfermedad/trastorno, con el propósito de curar, sanar, aliviar, alterar, remediar, mejorar, potenciar o afectar a la enfermedad, el síntoma de la enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad.

Aquellos que "necesitan tratamiento" incluyen a los que ya están con el trastorno, así como aquellos en los que se debe prevenir el trastorno. El término "trastorno" es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con la

formulación proteica descrita en este documento. Esto incluye trastornos crónicos y agudos o enfermedades, incluidas aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitativos de trastornos a tratar en este documento incluyen los trastornos inflamatorios y autoinmunes, preferiblemente incluyendo trastornos alérgicos y psoriásicos, así como trastornos artríticos y asmáticos, p. ej.,

5 artritis, artritis reumatoide (AR), encefalitis autoinmune, psoriasis, esclerosis múltiple, enfermedad pulmonar como el asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS); enfermedad de Crohn, fibrosis pulmonar idiopática (IPF), enfermedad inflamatoria intestinal (EII), uveítis, degeneración macular, colitis, degeneración Walleriana, síndrome antifosfolípido (APS), síndrome coronario agudo,

10 restinosis, aterosclerosis, policondritis recidivante (RP), hepatitis aguda o crónica, implantes ortopédicos fallidos, glomerulonefritis, lupus, dermatitis atópica y dolor inflamatorio, artrítico y osteoartrítico.

Un trastorno alérgico es cualquier trastorno causado por alguna alergia o reacción alérgica. Una alergia es un trastorno de hipersensibilidad del sistema inmunitario. Se produce cuando el sistema inmunitario de una persona reacciona, o reacciona exageradamente, a sustancias extrañas normalmente inofensivas (alérgenos), como alimentos, polen, mohos, polvo de la casa, pelo de animales, ácaros del polvo.

15 La psoriasis es una enfermedad autoinmune que afecta principalmente a la piel. El ciclo de crecimiento de las células de la piel se acelera debido a señales erróneas enviadas por el sistema inmunitario. Hay cinco tipos de psoriasis: en placas, guttata, inversa, pustulosa y eritrodérmica. La forma más común, la psoriasis en placas, aparece comúnmente como tonos rojizos y blanquecinos de manchas escamosas que aparecen en la primera capa superior de la epidermis (piel). Algunos pacientes, sin embargo, no padecen de signos o síntomas dermatológicos.

20 El trastorno es una afección recurrente crónica que varía en su gravedad desde manchas localizadas menores hasta una cobertura corporal completa. Las uñas de las manos y las uñas de los pies se ven frecuentemente afectadas (distrofia psoriásica de las uñas) y pueden ser vistas como un signo aislado. La psoriasis también puede causar inflamación de las articulaciones; lo que se conoce como artritis psoriásica.

25 La artritis es una forma de trastorno articular que implica inflamación de una o más articulaciones. Hay más de 100 formas de artritis. La forma más común, la osteoartritis (enfermedad articular degenerativa), es el resultado de un traumatismo en las articulaciones, infección de las articulaciones o edad. Otras formas de artritis son la artritis reumatoide, la artritis psoriásica y otras enfermedades autoinmunes relacionadas. La artritis séptica está causada por una infección de las articulaciones.

30 El asma es un trastorno inflamatorio crónico común de las vías respiratorias en el que muchas células y elementos celulares desempeñan un papel. El asma se asocia con la hipersensibilidad en las vías respiratorias que conduce a episodios recurrentes de sibilancias, tos, opresión en el pecho y dificultad para respirar. Estos episodios generalmente se asocian con una obstrucción generalizada, pero variable del flujo de aire dentro del pulmón que a menudo es reversible, ya sea espontáneamente o con tratamiento. El asma se puede clasificar según la frecuencia de los síntomas, el volumen espiratorio forzado en un segundo y el caudal espiratorio máximo. El asma también

35 puede clasificarse como atópico (extrínseco) o no atópico (intrínseco).

Además de los compuestos neutralizantes de GM-CSF, la composición farmacéutica de la invención puede comprender agentes terapéuticos o biológicamente activos adicionales. Por ejemplo, pueden estar presentes factores terapéuticos útiles en el tratamiento de una indicación particular como la osteoartritis (por ejemplo, uno o más inhibidores que están involucrados en la destrucción del cartílago articular o componentes sinoviales

40 seleccionados, pero no se limita a antimetaloproteinasas, compuestos de ciclina, antagonistas de la citoquina, corticosteroides, inhibidores del TNF, inhibidores de IL, sustancias anti-angiogénicas, inhibidores de la agreganasa, inhibidores de la quinasa p38, inhibidores de la apoptosis, inhibidores de la hialuronidasa e inhibidores de las enzimas proteolíticas). Factores que controlan la inflamación, incluyendo infliximab, etanercept, adalimumab, nerelimonmab, lenercept, etc., o sus combinaciones, pueden ser parte de la composición. También se prevé que la

45 composición farmacéutica pueda incluir componentes de la matriz extracelular como el ácido hialurónico o un derivado del mismo, incluyendo sales, derivados de éster, éster interior y sulfatados, preferiblemente un éster parcial del ácido hialurónico.

En otra realización, la presente invención se refiere a un kit (o artículo de fabricación) o envase, que contiene una formulación de la invención. La formulación puede preferentemente ya estar en estado líquido. Sin embargo,

50 alternativamente, puede estar preferiblemente en un estado liofilizado. También puede estar en un estado congelado, liofilizado, o secado por pulverización. En consecuencia, si la formulación está en estado distinto del líquido, puede ser preparado por el practicante como una composición farmacéutica acuosa (líquida). Por ejemplo, la formulación puede ser liofilizada y para luego tener que ser reconstituida. En consecuencia, el kit puede comprender además medios para la reconstitución de una formulación congelada, liofilizada, o secada por pulverización y/o

55 medios para diluir la formulación y/o medios para administrar la formulación o composición farmacéutica, respectivamente, como una jeringa, una bomba, un infusor, una aguja o similares. El kit puede comprender uno o más viales que contengan la formulación de la invención. El kit también puede ir acompañado de instrucciones de uso.

60 Por lo tanto, se proporciona un artículo de fabricación que contiene una formulación descrita en el presente documento y, preferiblemente, proporciona instrucciones para su uso. El artículo de fabricación comprende un

recipiente adecuado para contener la formulación. Los envases adecuados incluyen, entre otros, frascos, viales (por ejemplo, viales de doble cámara), jeringas (por ejemplo, jeringas de cámara simple o doble), tubos de ensayo, nebulizadores, inhaladores (p. ej., inhaladores de dosis medidas o inhaladores de polvo seco) o depósitos. El recipiente se puede formar a partir de una variedad de materiales, como vidrio, metal o plástico (por ejemplo, policarbonato, poliestireno, polipropileno, poliolefina). El recipiente contiene la formulación, y la etiqueta en el
 5 recipiente, o adjunta a éste, puede indicar instrucciones para su reconstitución y / o uso. La etiqueta puede indicar además que la formulación sea útil o que esté destinada a una administración subcutánea. El recipiente que contiene la formulación puede ser un vial multiusos, lo que permite administraciones repetidas (por ejemplo, de 2-6 administraciones) de la formulación. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que
 10 comprenda un diluyente adecuado (por ejemplo, WFI, 0,9% de NaCl, BWFI, solución salina tamponada de fosfato). Cuando el artículo de fabricación comprende una versión liofilizada de una formulación del compuesto neutralizante de GM-CSF, la mezcla de un diluyente con la formulación liofilizada proporcionará una concentración de proteína final deseada en la formulación reconstituida. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluidos otros tampones, diluyentes, filtros, agujas,
 15 jeringas y prospectos de los envases con las correspondientes instrucciones de uso.

También se incluyen en la presente descripción dispositivos que pueden utilizarse para suministrar la formulación de la presente descripción. Ejemplos de estos dispositivos incluyen, entre otros, una jeringa, un lápiz dosificador, un implante, un dispositivo de inyección sin agujas, un dispositivo de inhalación y un parche.

La invención se ilustra además con figuras y ejemplos que son meramente ilustrativos y que no se construyen como una limitación del alcance de la presente invención. Las figuras muestran:

Figura 1: Efecto del tiempo de almacenamiento, temperatura de almacenamiento y concentración de proteínas en el nivel de monómero del anticuerpo anti-GM-CSF.

Figura 2: Diagrama de Pareto del efecto estandarizado con la osmolalidad [mOsmol/kg] como variable.

Los siguientes Ejemplos Ilustran la presente invención.

25 Ejemplo 1: Materiales

Los siguientes ejemplos se llevaron a cabo con un anticuerpo monoclonal IgG1 humano (en lo siguiente denominado "el anticuerpo") que se une y neutraliza con alta afinidad y especificidad el GM-CSF humano y que se describe en el documento WO 2006/111353. Su generación se describe en el Ejemplo 2 del documento WO 2006/111353. Más específicamente, el anticuerpo comprende las secuencias de la cadena ligera y la cadena pesada de CDR, como se muestra en las SEQ ID NO: 16, 17, 18, 14, 15 y 2. Estas secuencias CDR se componen del dominio variable de la cadena pesada y la ligera, respectivamente, que se muestran en las SEQ ID NO: 34 y 35, respectivamente. GM-CSF se produce de manera aberrante y sobreproducida en una multitud de enfermedades humanas proinflamatorias y autoinmunes, y se ha encontrado que la adición de GM-CSF recombinante agrava dichas enfermedades. Las posibles indicaciones patológicas para el tratamiento con un anticuerpo neutralizante de GM-CSF incluyen la artritis reumatoide (AR), el asma y otras formas de inflamación pulmonar, la esclerosis múltiple (EM) y la psoriasis.

El anticuerpo fue producido en un biorreactor usando un medio sin suero y proteínas. El inóculo para la producción fermentada se preparó a partir de un solo vial del clon productor del anticuerpo. Una vez completados los procesos de fermentación, la recuperación que contiene el anticuerpo secretado es procesado por filtración para separar las células y los restos del sobrenadante. La purificación de la recuperación se basa en enfoques cromatográficos comunes para reducir los HCP, ADN y potenciales virus. Una etapa de inactivación integral del virus fue una parte adicional del proceso posterior. Para producir la formulación, se realizó una etapa de concentración e intercambio de tampón.

Ejemplo 2: Métodos de prueba

Fue establecida la Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento de Exclusión por Tamaños (SE-HPLC) para determinar el grado de agregación del anticuerpo (HPLC: Agilent 1100 Chemstation; columna: Tosoh Biosep TSKgel G4000SWXL). El método SE-HPLC se calificó mediante la realización de una prueba de intervalo de nueve puntos, a partir de la cual la precisión (seis inyecciones por réplica) y la linealidad (curvas estándar triplicadas) se determinaron y probaron. Todos los ensayos se realizaron usando 100 mM de KH_2PO_4 , 200 mM de Na_2SO_4 , pH 6,6 como tampón de operación.

Se estableció el método de la resonancia de plasmón de superficie (SPR) para determinar el grado de actividad de unión de los anticuerpos frente al GM-CSF inmovilizado (Biacore 3000 / CHIP sensor CM5 / tampón de operación HBS-EP). El método SPR se calificó mediante la realización de una prueba de intervalos de nueve puntos, a partir del cual fueron determinadas y probadas la precisión (seis inyecciones por réplica) y la linealidad (curvas estándar por triplicado).

Se realizó una SDS-PAGE de reducción y de no reducción para la detección de los productos de degradación (fragmentos) y los agregados del anticuerpo.

Ejemplo 3: Efecto del estrés por pH y temperatura

5 Fue realizado un estudio para evaluar la estabilidad del anticuerpo en un tampón de selección de baja fuerza iónica (LISSB: glicina 2 mM, 2 mM de ácido cítrico, 2 mM de HEPES, 2 mM de MES, y 2 mM de Tris) a valores de pH que iban de 3 a 10. Las muestras de anticuerpos se almacenaron en las soluciones respectivas a 55°C durante un período de 14 días. A los T0, T7 y T14 (días) las muestras fueron analizadas. El análisis SPR indicó que el anticuerpo era más estable a pH 4-7. Cuando se analizaba por SE-HPLC el monómero del anticuerpo se encontró que era más estable a pH 4-6 (T14). Ambas SDS-PAGE no reductora y reductora de las muestras T14 muestran solamente una formación mínima de productos de degradación y agregados a pH 4-6.

Ejemplo 4: Efecto del estrés por fuerza iónica y temperatura

10 Se realizó un estudio para evaluar la estabilidad del anticuerpo en el tampón de cribado de baja fuerza iónica (LISSB) en presencia de 0, 10, 100 y 500 mM de NaCl. Las muestras de anticuerpo se dializaron en soluciones de LISSB (pH 4,5 y pH 7,5) con más NaCl a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml y se almacenó a 55°C durante un período de 14 días. A T0, T7 y T14 (días) fueron analizadas las muestras por SE-HPLC y SPR.

15 Los estudios HPLC y SPR indican que la adición de sales deteriora la estabilidad del anticuerpo y que el efecto es más pronunciado a pH 4,5 que a pH 7,5. Además, los datos HPLC muestran que la desestabilización del anticuerpo con concentraciones elevadas de sal (≥ 100 mM) a pH 4,5 da como resultado principalmente la acumulación de agregados del anticuerpo. A pH 7,5, la desestabilización del anticuerpo a concentraciones elevadas de sal (500 mM) principalmente da como resultado la acumulación de los productos de degradación del anticuerpo. En LISSB a pH 4,5; NaCl 500 mM, el nivel de precipitación (T7 y T14) del anticuerpo fue muy alto.

Ejemplo 5: Efecto de los tampones

20 Se realizó un estudio para evaluar la estabilidad del anticuerpo en varios tampones a pH 5-7. Las muestras de anticuerpos se dializaron en soluciones de tampón citrato 20 mM a pH 5, 6 y 7; tampón fosfato 20 mM, pH 6 y pH 7; tampón succinato 20 mM, pH 6 y pH 7, tampón histidina 20 mM, pH 6 y pH 7; y tampón acetato 20 mM, pH 5 y pH 6 a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml y se almacenó a 55°C durante un período de 14 días. A T0, T7 y T14 (días) las muestras fueron analizadas por SE-HPLC, SPR, y SDS-PAGE reductora y no reductora.

25 El estudio SPR, los datos de monómero HPLC y agregado y la SDS-PAGE reductora y no reductora indican que el anticuerpo es más estable en tampón acetato pH 5, tampón histidina pH 6 y tampón citrato pH 5, 6 y 7 (datos T14).

Ejemplo 6: Efecto de los aminoácidos

30 Se realizó un estudio para evaluar la estabilidad del anticuerpo en tampón de selección a baja fuerza iónica (LISSB) con la adición de diferentes aminoácidos. Fueron almacenadas muestras de anticuerpo en la disolución a pH 6 con 250 mM de los aminoácidos respectivos a 55°C durante un período de 14 días. A T0, T7 y T14 (días) las muestras se analizaron. El estudio SPR indica un efecto ligeramente estabilizador especialmente de ácido glutámico, trionina, lisina y valina (T14). Los datos HPLC indican un efecto estabilizador y significativo del ácido glutámico, treonina y alanina resultante en aproximadamente 2-3% más de monómero intacto y aproximadamente 30%, 31% y 20% menos de agregados, respectivamente, en comparación con la referencia a cuando no se añade ningún aminoácido.

Ejemplo 7: Efecto de azúcares y tensioactivos

40 Se realizó un estudio para evaluar la estabilidad del anticuerpo en el tampón de selección de baja fuerza iónica (LISSB) con la adición de varios azúcares o tensioactivos. Las muestras de anticuerpo fueron dializadas en soluciones de LISSB a pH 6,0 a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml con un 6% adicional (p/v) de azúcares (D-manitol, D-sorbitol, sacarosa D-manosa, D-maltosa, D-trehalosa, D-glucosa), 0,05% (v/v) de Tween 20 o 0,02% (v/v) de Tween 80, y se almacenaron a 55°C durante un período de 14 días. A T0, T7 y T14 (días) las muestras fueron analizadas por SE-HPLC, SPR y SDS-PAGE reductora y no reductora.

45 Los estudios SPR y HPLC indican que D-sorbitol y D-manitol mejoran la estabilidad del anticuerpo en aproximadamente 20% / 3% (datos SPR/HPLC, T14) y 14% / 4% (datos SPR/HPLC, T14), respectivamente. La trehalosa y la sacarosa tienen peores efectos en un 7% / 0,7% (SPR/HPLC, T14) y 6% / 2% (SPR/HPLC, T14), respectivamente. Además los datos de HPLC indican que D-sorbitol y D-manitol reducen la formación de los agregados de anticuerpos en un 43% y un 50%, respectivamente, lo que también está respaldado por los datos obtenidos por SDS-PAGE. Ninguno de los Tween 20 al 0,05% (v/v) ni Tween 80 al 0,02% (v/v) parecía mejorar la estabilidad del anticuerpo.

Ejemplo 8: Efecto de combinaciones de tampones, aminoácidos y azúcares

50 En base a estudios previos, se realizó un estudio para evaluar la estabilidad de 1 mg/ml del anticuerpo formulado en combinaciones de tampones, aminoácidos y azúcares. Los estudios anteriores indicaron efectos estabilizadores de: acetato 20 mm pH 5; histidina 20 mm pH 6; ácido glutámico 250 mM; treonina 250 mm, 6% (p/v) de sorbitol y 6% (p/v) de manitol. El anticuerpo fue formulado a una concentración de 5,4 mg/ml en soluciones de combinaciones de

tampón 20 mM, aminoácido 250 mM y 6% (v/v) de azúcar como se indica en la Tabla 1, y se almacenó a 55°C durante un período de 14 días. El anticuerpo en 1xpbs fue incluido como control. A T0, T7 y T14 (días), las muestras fueron analizadas por SE-HPLC y SPR.

5 Además, se analizaron las muestras a T0 que comprendían el anticuerpo (5,4 mg/ml) a 1xPBS para determinar la capacidad de congelación y descongelación. Los viales de almacenamiento se congelaron lentamente a -20°C en el congelador. Después de completar la congelación, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente. Este procedimiento se repitió hasta que se hubieron completado cinco ciclos de congelación y descongelación. Cada muestra fue examinada para la recuperación SPR y SE-HPLC después de dos y cinco ciclos.

10 Tabla 1: Combinación de tampones, azúcares y aminoácidos (Ac = tampón acetato; His = tampón histidina; M = manitol; S = sorbitol)

| Muestra | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
|------------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|-------|
| Tampón | Ac | X | X | | | X | X | | | X | X | X | X | | | | | 1xPBS |
| | His | | | X | X | | | X | X | | | | | X | X | X | X | |
| Aminoácido | Glu | X | | X | | | | | | X | X | | | X | X | | | |
| | Thr | | X | | X | | | | | | | X | X | | | X | X | |
| Azúcar | M | | | | | X | | X | | X | | X | | X | | X | | |
| | S | | | | | | X | | X | | X | | X | | X | | X | |

15 Los datos SPR muestran que las actividades de unión en las muestras 5-16 a T14/55°C son >93% respecto a T0. Para el anticuerpo en 1xPBS (muestra 17) y muestras 1-4 (todas sin manitol o sorbitol), los números son 62%, 19%, 26%, 91% y 85%, respectivamente. Los datos SPR, por lo tanto, indican que la adición de manitol o sorbitol mejora la estabilidad de la actividad de unión. Además, las muestras 1-4 aparecían amarillentas a T7 y T14 indicando oxidación. Los datos de SE-HPLC muestran que los niveles más bajo de agregados (3,5% - 5,6%) y productos de degradación (4,2% - 5,4%) se encuentran en las muestras 5-8, 11-12 y 15-16 (datos T14/55°C), apoyando el efecto estabilizador del manitol y el sorbitol en el monómero del anticuerpo e indicando un posible efecto menor al añadir treonina 250 mM. El efecto de la treonina es, sin embargo, al menos mínimamente juzgado por los niveles de monómeros encontrados en las muestras 5-8, 11-12 y 15-16 (91,2%, 89,8%, 91,5%, 90,8%, 89,8%, 89,0%, 91,4% y 90,9%, respectivamente) -para la muestra 17 (PBS) el número es 80,3% (datos T14/55°C). No tuvo ningún efecto negativo 250 mM de ácido glutámico junto con sorbitol o manitol en la estabilidad del monómero del anticuerpo, especialmente en el tampón acetato. En conclusión, el monómero del anticuerpo parece ser el más estable en combinación del tampón acetato 20 mM, a pH 5 o tampón histidina 20 mM a pH 6 y 6% (p/v) de sorbitol o manitol al 6% (p/v).

20 Los datos SE-HPLC de los experimentos de congelación/descongelación indican un efecto superior menor del sorbitol respecto al manitol en la estabilización del monómero del anticuerpo. En las muestras 6 y 8, el contenido de monómeros es del 98,6% y del 98,4%, respectivamente, después de 5 rondas de congelación/descongelación en comparación con el contenido de monómeros en las muestras 5 y 7 del 96,9% y 96,0%.

Ejemplo 9: Efecto de las combinaciones de histidina o acetato, sorbitol o manitol, y Tween 20 o Tween 80

35 Sobre la base de los datos de estabilidad de los estudios anteriores (que muestran un efecto estabilizador en particular de acetato 20 mM pH 5, 20 mM de histidina pH 6, 6% (p/v) de sorbitol y 6% (p/v) de manitol), se realizó un nuevo estudio para evaluar la estabilidad de 10 mg/ml del anticuerpo formulado en combinaciones de tampones de histidina o acetato, sorbitol o manitol, y Tween 20 o Tween 80. Debido a las concentraciones del anticuerpo a 10 mg/ml, también se probó la adición de 0,02% (p/v) de Tween 20 y 0,02% (p/v) de Tween 80 para determinar su efecto sobre la agregación.

40 El anticuerpo se formuló a una concentración de 10 mg/ml en soluciones de tampón de acetato de 20 mM pH 5,0 o 20 mM de tampón de histidina pH 6,0 y con los aditivos indicados en la Tabla 2, y se almacenó a 55°C durante un período de 14 días. A T0, T7 y T14 (días), las muestras fueron analizadas por SE-HPLC y SPR.

45 Además, se analizaron muestras de anticuerpos para detectar la capacidad de congelación y descongelación. El anticuerpo se congeló lentamente a una concentración de 10 mg/ml a 20°C en el congelador. Una vez completada la congelación, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente. Este procedimiento se repitió hasta que se hubieron completado tres y/o cinco ciclos de congelación y descongelación. Cada muestra se examinó para determinar la recuperación de SPR y SE-HPLC después de tres y/o cinco ciclos de congelación y descongelación.

Tabla 2: Combinación de tampones, azúcares y detergentes (Ac = tampón acetato; His= tampón histidina; M = manitol; S = sorbitol; T20 = Tween 20; T80 = Tween 80)

| Muestra | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| Tampón | Ac | X | X | | | X | X | X | X | | | | |
| | His | | | X | X | | | | | X | X | X | X |
| Azúcar | M | | X | | X | | | X | X | | | X | X |
| | S | X | | X | | X | X | | | X | X | | |
| Detergente | T20 | | | | | X | | X | | X | | X | |
| | T80 | | | | | | X | | X | | X | | X |

5 Los datos de HPLC mostraron claramente que 0,02% (p/v) de Tween 20 y 0,02% (p/v) de Tween 80 tenía un efecto negativo en la estabilidad del monómero del anticuerpo. Después de 14 días de almacenamiento a 55°C, se quedó aproximadamente un 89-90% de monómero del anticuerpo formulado sin detergentes y se quedó aproximadamente un 83-88% de monómero del anticuerpo formulado con detergentes añadidos. La pérdida de monómero del anticuerpo está causando principalmente niveles más altos de agregados de anticuerpos (aproximadamente 7,6%-10,3%) cuando se añaden detergentes. Sin Tween 20 y Tween 80, los agregados de anticuerpos constituyen aproximadamente 5,2%-6,4%. Aunque la diferencia entre el acetato y la histidina como sistema tampón es menor, la histidina parece al menos tan buena como el acetato.

15 Los experimentos de congelación y descongelación indican que no hay al menos ningún efecto positivo de los detergentes en el nivel del monómero del anticuerpo después de cinco rondas de congelación y descongelación. Sin embargo, el monómero del anticuerpo es más estable cuando se añade un 6% (p/v) de sorbitol a la formulación en comparación con el 6% (p/v) de manitol. Con el manitol añadido, el monómero del anticuerpo se agrega en un grado más alto después de cinco rondas de congelación y descongelación. Los datos de HPLC del experimento de congelación y descongelación no muestran ninguna diferencia entre el uso de acetato e histidina.

20 En conclusión, una preformulación que contiene 20 mM de histidina, pH 6,0 y 6% (p/v) sorbitol parece óptima para la estabilidad del monómero del anticuerpo.

Ejemplo 10: Evaluación de la estabilidad a corto plazo de una pre-formulación de histidina 20 mM, 6% (p/v) de D-sorbitol

25 En base a la identificación de 20 mM de histidina a pH 6,0 y 6% (p/v) de sorbitol como preformulación óptima, se realizó una prueba de estabilidad a corto plazo para evaluar esta preformulación a concentraciones más altas del anticuerpo.

El anticuerpo fue formulado en la solución anterior a concentraciones de aproximadamente 22, 36, 42, 83 y 118 mg/ml. El anticuerpo formulado se almacenó a 5°C y 25°C durante un periodo de hasta 4 semanas. A T0, T14 y T28 (días), las muestras fueron analizadas por SE-HPLC.

30 Los datos de SE-HPLC muestran claramente que el anticuerpo es estable a 20 mM de histidina pH 6,0, 6% (p/v) sorbitol. La concentración del monómero del anticuerpo detectada después de 28 días de almacenamiento a 5°C o 25°C siempre fue superior al 97%, con la excepción de la mayor concentración de anticuerpos probada (118 mg/ml) a 25°C, donde la concentración del monómero del anticuerpo fue de aproximadamente el 96,5%. Los resultados se muestran en la FIG. 1.

Ejemplo 11: Ajuste fino de los excipientes finales

35 En base a los datos generados en los experimentos anteriores, el sorbitol y la histidina se han elegido para estabilizar el anticuerpo. En el siguiente paso, la cantidad de excipientes, así como el valor de pH se ajustaron para concentraciones de anticuerpos entre 10 y 100 mg/ml utilizando el "Diseño del Experimento" (DOE), incluyendo 3 puntos centrales y dando como resultado 30 repasos individuales. El plan experimental aleatorizado se llevó a cabo con los siguientes parámetros:

40 Anticuerpo: 10-55-100 mg/ml
pH: 5-6-7

Histidina: 10-30-50 mM

Sorbitol: 2-6-10% (p/v)

5 Para permitir una evaluación a corto plazo, las muestras se estresaron en condiciones aceleradas de 50°C durante 14 días. Además, se realizaron tres ciclos de descongelación (-20°C) para reproducir las condiciones en almacenamiento del anticuerpo.

Resultados:

10 Se determinó que la osmolalidad aseguraba las condiciones fisiológicas para la formulación. Para una aplicación i.v. o s.c. del anticuerpo, una osmolalidad entre 250 y 450 mOsmol/kg es un intervalo aceptable. Como se muestra en la FIG. 2, la osmolalidad se controla principalmente por la cantidad de sorbitol en la formulación. Tanto la histidina a concentraciones bajas (10-50 mM) como el propio anticuerpo sólo tienen efectos mínimos sobre la osmolalidad.

15 La dependencia de la osmolalidad en la concentración de sorbitol e histidina se puede representar en una transferencia de contorno. Esta transferencia muestra que para mantener la osmolalidad en el intervalo fisiológico, es necesaria una concentración entre el 3% y el 7% (p/v) de sorbitol. Los datos generados aluden a una concentración óptima de sorbitol de aproximadamente 6%, lo que resulta en un valor de osmolalidad bastante alto (>400 mOsmol/kg). Dado que una cierta reducción del sorbitol no afecta a la estabilidad del anticuerpo, la concentración de sorbitol puede reducirse al 5% para alcanzar una osmolalidad de unos 350 mOsmol/kg y, por lo tanto, para aumentar la conveniencia para el paciente.

20 La concentración óptima de histidina se estableció en 30 mM en función de los datos generados. En un intervalo de concentración entre 10 mM y 50 mM de histidina, no se detectó ningún impacto en la agregación o fragmentación, medido por HP-SEC.

25 La agregación del anticuerpo depende principalmente de la concentración. El aumento de las concentraciones de anticuerpo da como resultado un mayor nivel de agregado y un aumento de los valores de claridad durante la congelación/descongelación y en condiciones de tensión de temperatura acelerada. Además, el valor de pH afecta al contenido del monómero del anticuerpo. Mientras que la tensión acelerada a pH<6 conduce a una mayor fragmentación del anticuerpo, la estabilidad durante la congelación/descongelación no se ve afectada, sino que se observa una estabilidad ligeramente mejor. A valores de pH de pH>6, tanto para la temperatura acelerada como para el tratamiento de congelación/descongelación, el contenido reducido de monómero podría medirse mediante HP-SEC y análisis de claridad. Con el fin de equilibrar los efectos contrarios, un pH de 5,8 parece ser más adecuado para la formulación de anticuerpos.

30 Esto dio como resultado una formulación con los siguientes parámetros:

| | |
|-----------------------|--|
| Anticuerpo | 10 mg/ml-55 mg/ml-100 mg/ml |
| D-sorbitol | 5% (p/v) |
| Tampón de L-histidina | 30 mM (monohidrato de hidrócloruro) |
| pH | 5,8 (ajustado con hidróxido sódico 2M) |

35 Las condiciones o parámetros de esta composición también se pueden transmitir a una composición con mayores concentraciones de anticuerpos, como se mostrará en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 12: Estudios de estabilidad

a) Estudios a largo plazo

40 El estudio fue diseñado para un período de prueba de hasta 60 meses. Durante este período, se almacenaron muestras de anticuerpos a +5°C±3°C en viales de vidrio DIN R2. Además, se realizó un estudio acelerado a +25°C ± 2°C y un estudio del estrés a +40°C±2°C en viales de vidrio DIN R2 durante un máximo de 12 y 6 meses, respectivamente. Las pruebas se llevaron a cabo utilizando el anticuerpo a una concentración de 106 mg/ml y 145 mg/ml, en una formulación con monohidrócloruro de histidina de 30 mM y sorbitol al 5% (p/v) a pH 5,8.

45 Se midieron los siguientes parámetros: pH, osmolalidad, concentración (OD280), porcentaje de monómeros, agregados y fragmentos por SE-HPLC, potencia (ensayo basado en células). Los resultados se muestran en las siguientes Tablas 3-8.

ES 2 794 449 T3

Tabla 3: Ensayo de estabilidad a +5°C ± 3°C (106 mg/ml anticuerpo)

| Tiempo de almacenamiento | pH | Osmolalidad | Concentración (OD280) | Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F) SE-HPLC | | | Potencia (ensayo basado en células) |
|--------------------------|------|-------------|-----------------------|--|------|------|--|
| [Meses] | - | [mOsmol/kg] | [mg/ml] | M / A / F [%] | | | Potencia relativa (en comparación con el estándar de referencia) |
| 0 | 5,83 | 379 | 106,51 | 99,20 | 0,80 | 0 | 0,83 |
| 1 | 5,88 | 379 | 103,00 | 99,18 | 0,82 | 0 | 1,03 |
| 3 | 5,90 | 379 | 108,75 | 99,07 | 0,93 | 0 | 1,23 |
| 6 | 5,89 | 376 | 100,05 | 98,87 | 1,13 | 0 | 0,89 |
| 9 | 5,83 | 377 | 102,59 | 99,01 | 0,99 | 0 | 1,00 |
| 12 | 5,86 | 387 | 103,34 | 98,97 | 1,03 | 0 | 1,01 |
| 18 | 5,87 | 379 | 102,49 | 98,78 | 1,04 | 0,18 | 0,84 |
| 24 | 5,85 | 377 | 101,73 | 98,68 | 1,11 | 0,21 | 1,05 |
| 30 | 5,81 | 383 | 102,52 | 98,55 | 1,17 | 0,28 | 0,83 |
| 36 | 5,84 | 380 | 107,78 | 98,56 | 1,18 | 0,25 | 1,06 |
| 42 | 5,92 | 384 | 96,32 | 98,34 | 1,11 | 0,55 | 1,26 |
| 48 | 5,90 | 376 | 94,33 | 98,54 | 1,23 | 0,23 | 1,03 |
| 54 | 5,86 | 382 | 107,67 | 98,25 | 1,28 | 0,47 | 1,04 |
| 60 | 5,90 | 379 | 106,79 | 98,26 | 1,26 | 0,48 | 0,97 |

Tabla 4: Ensayo de estabilidad a +5°C ± 3°C (145 mg/ml anticuerpo)

| Tiempo de almacenamiento | pH | Osmolalidad | Concentración (OD280) | Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F) SE-HPLC | | | Potencia (ensayo basado en células) |
|--------------------------|------|-------------|-----------------------|--|------|------|--|
| [Meses] | - | [mOsmol/kg] | [mg/ml] | M / A / F [%] | | | Potencia relativa (en comparación con el estándar de referencia) |
| 0 | 5,91 | 392 | 143,31 | 99,10 | 0,90 | 0 | 0,72 |
| 1 | 5,91 | 393 | 139,52 | 99,06 | 0,94 | 0 | 0,95 |
| 3 | 5,93 | 385 | 139,44 | 98,89 | 1,11 | 0 | 1,06 |
| 6 | 5,90 | 381 | 145,66 | 98,79 | 1,21 | 0 | 0,81 |
| 9 | 5,87 | 383 | 144,12 | 98,86 | 1,14 | 0 | 1,07 |
| 12 | 5,89 | 388 | 140,52 | 98,80 | 1,20 | 0 | 1,13 |
| 18 | 5,90 | 387 | 143,66 | 98,62 | 1,22 | 0,16 | 1,09 |
| 24 | 5,85 | 385 | 137,07 | 98,45 | 1,38 | 0,17 | 0,83 |
| 30 | 5,84 | 387 | 131,98 | 98,30 | 1,42 | 0,28 | 0,87 |
| 36 | 5,88 | 384 | 148,55 | 98,35 | 1,39 | 0,26 | 0,99 |
| 42 | 5,94 | 383 | 134,11 | 98,17 | 1,33 | 0,50 | 0,97 |

ES 2 794 449 T3

| | | | | | | | |
|----|------|-----|--------|-------|------|------|------|
| 48 | 5,94 | 385 | 125,09 | 98,23 | 1,50 | 0,26 | 1,03 |
| 54 | 5,90 | 394 | 150,81 | 97,94 | 1,57 | 0,49 | 1,04 |
| 60 | 5,90 | 386 | 147,01 | 97,94 | 1,53 | 0,53 | 0,82 |

Tabla 5: Pruebas de estabilidad a +25°C ± 2°C (106 mg/ml anticuerpo)

| Tiempo de almacenamiento | pH | Osmolalidad | Concentración (OD280) | Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F) SE-HPLC | | | Potencia (ensayo basado en células) |
|--------------------------|------|-------------|-----------------------|--|------|------|--|
| [Meses] | - | [mOsmol/kg] | [mg/ml] | M / A / F [%] | | | Potencia relativa (en comparación con el estándar de referencia) |
| 0 | 5,83 | 379 | 106,51 | 99,20 | 0,80 | 0 | 0,83 |
| 1 | 5,84 | 385 | 101,35 | 98,77 | 1,06 | 0,17 | 1,20 |
| 3 | 5,90 | 382 | 107,36 | 98,15 | 1,44 | 0,42 | 0,92 |
| 6 | 5,85 | 387 | 100,14 | 97,85 | 1,51 | 0,64 | 1,00 |
| 9 | 5,83 | 374 | 107,49 | 94,71 | 1,49 | 3,80 | 1,10 |
| 12 | 5,85 | 383 | 106,27 | 94,71 | 1,56 | 3,73 | 1,30 |

Tabla 6: Pruebas de estabilidad a +25°C ± 2°C (145 mg/ml anticuerpo)

| Tiempo de almacenamiento | pH | Osmolalidad | Concentración (OD280) | Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F) SE-HPLC | | | Potencia (ensayo basado en células) |
|--------------------------|------|-------------|-----------------------|--|------|------|--|
| [Meses] | - | [mOsmol/kg] | [mg/ml] | M / A / F [%] | | | Potencia relativa (en comparación con el estándar de referencia) |
| 0 | 5,91 | 392 | 143,31 | 99,10 | 0,90 | 0 | 0,72 |
| 1 | 5,90 | 384 | 142,84 | 98,49 | 1,19 | 0,31 | 0,95 |
| 3 | 5,93 | 386 | 147,84 | 98,12 | 1,50 | 0,37 | 1,04 |
| 6 | 5,88 | 383 | 134,73 | 97,62 | 1,78 | 0,60 | 0,78 |
| 9 | 5,91 | 387 | 144,59 | 94,46 | 1,85 | 3,69 | 0,97 |
| 12 | 5,87 | 387 | 143,12 | 94,36 | 1,90 | 3,74 | 1,23 |

5

Tabla 7: Pruebas de estabilidad a +40°C ± 2°C (106 mg/ml anticuerpo)

| Tiempo de almacenamiento | pH | Osmolalidad | Concentración (OD280) | Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F) SE-HPLC | | | Potencia (ensayo basado en células) |
|--------------------------|------|-------------|-----------------------|--|------|---|--|
| [Meses] | - | [mOsmol/kg] | [mg/ml] | M / A / F [%] | | | Potencia relativa (en comparación con el estándar de referencia) |
| 0 | 5,83 | 379 | 106,51, | 99,20 | 0,80 | 0 | 0,83 |

ES 2 794 449 T3

| | | | | | | | |
|---|------|-----|--------|-------|------|-------|------|
| 1 | 5,88 | 377 | 102,68 | 94,66 | 1,34 | 3,99 | 1,05 |
| 3 | 5,89 | 382 | 108,60 | 91,85 | 2,06 | 6,09 | 1,01 |
| 6 | 5,85 | 378 | 99,75 | 87,39 | 2,46 | 10,15 | 0,97 |

Tabla 8: Pruebas de estabilidad a +40°C ± 2°C (145 mg/ml anticuerpo)

| Tiempo de almacenamiento | pH | Osmolalidad | Concentración (OD280) | Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F) SE-HPLC | | | Potencia (ensayo basado en células) |
|--------------------------|------|-------------|-----------------------|--|------|-------|--|
| [Meses] | - | [mOsmol/kg] | [mg/ml] | M / A / F [%] | | | Potencia relativa (en comparación con el estándar de referencia) |
| 0 | 5,91 | 392 | 143,31 | 99,10 | 0,90 | 0 | 0,72 |
| 1 | 5,92 | 388 | 136,96 | 94,96 | 1,69 | 3,35 | 0,77 |
| 3 | 5,91 | 386 | 143,07 | 92,02 | 2,40 | 5,58 | 0,87 |
| 6 | 5,88 | 388 | 137,11 | 86,56 | 3,33 | 10,11 | 0,94 |

b) Estudios acelerados/de estrés

- 5 Para demostrar la capacidad comparación de la sustancia farmacológica después de la ampliación, se realizó un estudio de la estabilidad a condiciones aceleradas (25°C) y estresadas (40°C) utilizando dos lotes de sustancias farmacológicas con concentraciones de anticuerpos de 165 mg/ml y 171 mg/ml formuladas en una solución de 30 mM de histidina, 5% de sorbitol, pH 5,8.

- 10 Se midieron los siguientes parámetros: pH, osmolalidad, concentración (OD280), porcentaje de monómeros, agregados y fragmentos por SE-HPLC, potencia (ensayo basado en células). Los resultados de la concentración de anticuerpos de 171 mg/ml se muestran en las Tablas 9 y 10 siguientes.

Tabla 9: Pruebas de estabilidad a +25°C ± 2°C (171 mg/ml anticuerpo)

| Tiempo de almacenamiento | pH | Osmolalidad | Concentración (OD280) | Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F) SE-HPLC | | | Potencia (ensayo basado en células) |
|--------------------------|-----|-------------|-----------------------|--|-----|-----|--|
| [Meses] | - | [mOsmol/kg] | [mg/ml] | M / A / F [%] | | | Potencia relativa (en comparación con el estándar de referencia) |
| 0 | 5,7 | — | 169,00 | >99,0 | 0,6 | <1% | 0,97 |
| 2 | 5,6 | — | 171,00 | 98,3 | 1,7 | <1% | 0,92 |
| 3 | 5,7 | — | 173,00 | 98,0 | 2,0 | <1% | 1,14 |

Tabla 10: Pruebas de estabilidad a +40°C ± 2°C (171 mg/ml anticuerpo)

| Tiempo de almacenamiento | pH | Osmolalidad | Concentración (OD280) | Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F) SE-HPLC | | | Potencia (ensayo basado en células) |
|--------------------------|----|-------------|-----------------------|--|--|--|--|
| [Meses] | - | [mOsmol/kg] | [mg/ml] | M / A / F [%] | | | Potencia relativa (en comparación con el estándar de referencia) |

ES 2 794 449 T3

| | | | | | | | |
|---|-----|---|-------|-------|-----|-----|------|
| 0 | 5,7 | — | 169,0 | >99,0 | 0,6 | <1% | 0,97 |
| 2 | 5,6 | — | 171,0 | 92,5 | 2,9 | <5% | 0,90 |
| 3 | 5,7 | — | 175,0 | 90,3 | 3,5 | <7% | 0,91 |

c) Estudios de congelación/descongelación

5 La estabilidad de congelación/descongelación se probó para concentraciones de anticuerpos de 106 mg/ml y 145 mg/ml formulados en una solución de 30 mM de pH de histidina 5,8 y 5% de sorbitol. El anticuerpo se congeló a $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ durante al menos la noche. La descongelación se realizó durante ≥ 6 h a temperatura ambiente. Se llevaron a cabo varios ciclos de congelación/descongelación 0, 1, 3, 5, 7 y 10.

Se midieron los siguientes parámetros: pH, osmolalidad, concentración (OD280), porcentaje de monómeros, agregados y fragmentos por SE-HPLC, potencia (ensayo basado en células). Los resultados se muestran en las tablas 11 y 12.

10 Tabla 11: Pruebas de estabilidad de congelación/descongelación a $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ (106 mg/ml anticuerpo)

| Número de ciclos F/T | pH | Osmolalidad | Concentración (OD280) | Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F) SE-HPLC | | | Potencia (ensayo basado en células) |
|----------------------|------|-------------|-----------------------|--|------|---|--|
| | | | | M / A / F [%] | | | Potencia relativa (en comparación con el estándar de referencia) |
| [No.] | - | [mOsmol/kg] | [mg/ml] | M / A / F [%] | | | Potencia relativa (en comparación con el estándar de referencia) |
| 0x | 5,86 | 373 | 99,07 | 99,05 | 0,95 | 0 | 0,84 |
| 1x | 5,86 | 381 | 99,37 | 99,19 | 0,81 | 0 | 1,05 |
| 3x | 5,89 | 379 | 98,23 | 99,20 | 0,80 | 0 | 1,11 |
| 5x | 5,87 | 380 | 99,69 | 99,15 | 0,85 | 0 | 1,15 |
| 7x | 5,86 | 380 | 99,96 | 99,12 | 0,88 | 0 | 1,24 |
| 10x | 5,87 | 378 | 98,94 | 99,08 | 0,92 | 0 | 0,83 |

Tabla 12: Pruebas de estabilidad de congelación/descongelación a $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ (145 mg/ml anticuerpo)

| Número de ciclos F/T | pH | Osmolalidad | Concentración (OD280) | Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F) SE-HPLC | | | Potencia (ensayo basado en células) |
|----------------------|------|-------------|-----------------------|--|------|---|--|
| | | | | M / A / F [%] | | | Potencia relativa (en comparación con el estándar de referencia) |
| [No.] | - | [mOsmol/kg] | [mg/ml] | M / A / F [%] | | | Potencia relativa (en comparación con el estándar de referencia) |
| 0x | 5,86 | 373 | 133,13 | 98,94 | 1,06 | 0 | 0,81 |
| 1x | 5,90 | 379 | 132,98 | 99,11 | 0,89 | 0 | 1,16 |
| 3x | 5,89 | 380 | 134,56 | 99,09 | 0,91 | 0 | 1,04 |
| 5x | 5,90 | 384 | 132,74 | 99,07 | 0,93 | 0 | 1,11 |
| 7x | 5,90 | 383 | 134,54 | 99,03 | 0,97 | 0 | 1,04 |
| 10x | 5,91 | 385 | 132,89 | 98,96 | 1,04 | 0 | 1,05 |

d) Estabilidad de agitación

ES 2 794 449 T3

5 Este estudio se inició para obtener información sobre el impacto de la tensión de cizallamiento en el anticuerpo durante el procedimiento, desde el rellenado hasta la administración al paciente (por ejemplo, rellenado, envase, envío). Por lo tanto, el anticuerpo en una concentración de 106 mg/ml y 145 mg/ml y formulado en una solución de 30 mM de histidina a pH 5,8 y 5% de sorbitol se pasó sobre un agitador vertical en material de envase primario (viales de vidrio DIN R2). Los viales se almacenaron a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ hasta 14 días en un agitador en comparación con un control (almacenado sin agitación a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$). La recogida de puntos de datos se llevó a cabo después de 0, 1, 2, 3, 7 y 14 días.

10 Se midieron los siguientes parámetros: pH, osmolalidad, concentración (OD280), porcentaje de monómeros, agregados y fragmentos por SE-HPLC y potencia (ensayo basado en células). Los resultados se muestran en las siguientes Tablas 13-16.

Tabla 13. Pruebas de estabilidad de agitación a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ (106 mg/ml de anticuerpo) con agitación

| Tiempo de almacenamiento | pH | Osmolalidad | Concentración (OD280) | Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F) SE-HPLC | | | Potencia (ensayo basado en células) |
|--------------------------|------|-------------|-----------------------|---|------|---|--|
| [Días] | - | [mOsmol/kg] | [mg/ml] | M / A / F [%] | | | Potencia relativa (en comparación con el estándar de referencia) |
| 0 | 5,86 | 373 | 99,07 | 99,05 | 0,95 | 0 | 0,84 |
| 1 | 5,89 | 375 | 96,37 | 99,07 | 0,93 | 0 | n.d. |
| 2 | 5,92 | 376 | 99,84 | 99,04 | 0,96 | 0 | n.d. |
| 3 | 5,88 | 384 | 99,69 | 99,04 | 0,96 | 0 | 0,95 |
| 7 | 5,85 | 377 | 99,39 | 99,05 | 0,95 | 0 | 1,00 |
| 14 | 5,89 | 379 | 100,14 | 99,06 | 0,94 | 0 | 0,87 |

Tabla 14: Pruebas de estabilidad de agitación a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ (106 mg/ml anticuerpo) sin agitación

| Tiempo de almacenamiento | pH | Osmolalidad | Concentración (OD280) | Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F) SE-HPLC | | | Potencia (ensayo basado en células) |
|--------------------------|------|-------------|-----------------------|---|------|---|--|
| [Días] | - | [mOsmol/kg] | [mg/ml] | M / A / F [%] | | | Potencia relativa (en comparación con el estándar de referencia) |
| 0 | 5,86 | 373 | 99,07 | 99,05 | 0,95 | 0 | 0,84 |
| 1 | 5,93 | 380 | 96,54 | 99,09 | 0,91 | 0 | n.d. |
| 2 | 5,94 | 379 | 99,60 | 99,08 | 0,92 | 0 | n.d. |
| 3 | 5,86 | 378 | 98,98 | 99,05 | 0,95 | 0 | 0,98 |
| 7 | 5,85 | 378 | 98,79 | 99,02 | 0,98 | 0 | 1,04 |
| 14 | 5,92 | 384 | 99,43 | 99,08 | 0,92 | 0 | 1,13 |

15 Tabla 15. Pruebas de estabilidad de agitación a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ (145 mg/ml de anticuerpo) con agitación

| Tiempo de almacenamiento | pH | Osmolalidad | Concentración (OD280) | Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F) SE-HPLC | | | Potencia (ensayo basado en células) |
|--------------------------|----|-------------|-----------------------|---|--|--|-------------------------------------|
|--------------------------|----|-------------|-----------------------|---|--|--|-------------------------------------|

| [Días] | - | [mOsmol/kg] | [mg/ml] | M / A / F [%] | | | Potencia relativa (en comparación con el estándar de referencia) |
|--------|------|-------------|---------|---------------|------|---|--|
| 0 | 5,96 | 382 | 133,13 | 98,94 | 1,06 | 0 | 0,81 |
| 1 | 5,92 | 381 | 132,32 | 98,97 | 1,03 | 0 | n.d. |
| 2 | 5,94 | 385 | 135,31 | 98,93 | 1,07 | 0 | n.d. |
| 3 | 5,89 | 384 | 133,54 | 98,91 | 1,09 | 0 | 0,89 |
| 7 | 5,85 | 382 | 132,17 | 99,01 | 0,99 | 0 | 1,19 |
| 14 | 5,90 | 384 | 134,88 | 98,95 | 1,05 | 0 | 0,98 |

Tabla 16: Pruebas de estabilidad de agitación a +5°C ± 3°C (145 mg/ml de anticuerpo) con agitación

| Tiempo de almacenamiento | pH | Osmolalidad | Concentración (OD280) | Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F) SE-HPLC | | | Potencia (ensayo basado en células) |
|--------------------------|------|-------------|-----------------------|--|------|---|--|
| [Días] | - | [mOsmol/kg] | [mg/ml] | M / A / F [%] | | | Potencia relativa (en comparación con el estándar de referencia) |
| 0 | 5,96 | 382 | 133,13 | 98,94 | 1,06 | 0 | 0,81 |
| 1 | 5,92 | 382 | 132,70 | 98,98 | 1,02 | 0 | n.d. |
| 2 | 5,95 | 383 | 137,85 | 98,98 | 1,02 | 0 | n.d. |
| 3 | 5,89 | 385 | 138,28 | 98,93 | 1,07 | 0 | 0,71 |
| 7 | 5,88 | 380 | 133,11 | 98,93 | 1,07 | 0 | 1,16 |
| 14 | 5,90 | 387 | 135,40 | 98,93 | 1,07 | 0 | 0,79 |

e) Resultados y conclusiones

5 Se llevó a cabo un estudio de estabilidad a largo plazo que incluye condiciones aceleradas y estresadas durante un máximo de 60 meses para concentraciones de anticuerpos de aproximadamente 106 mg/ml y aproximadamente 145 mg/ml. También se llevaron a cabo estudios de estabilidad adicionales en condiciones aceleradas y estresadas para concentraciones de anticuerpos de hasta aproximadamente 171 mg/ml.

10 Durante el período de 60 meses, las muestras almacenadas a +5°C ± 3°C para ambas concentraciones mostraron una agregación inferior al 2% y tuvieron la misma potencia en comparación con la referencia. Después de 12 meses de almacenamiento en condiciones aceleradas (+25°C ± 2°C), ambas concentraciones (106 mg/ml y 145 mg/ml) mostraron menos del 2% de agregación y tuvieron la misma potencia que en comparación con la referencia. Después de 6 meses de almacenamiento en condiciones de estrés (+40°C ± 2°C), ambas concentraciones mostraron una agregación inferior al 5% y tuvieron aproximadamente la misma potencia en comparación con la referencia.

Los datos de los otros estudios acelerados/de estrés mostraron estabilidad durante 3 meses y 1 mes a 25°C y 40°C, respectivamente. Esto indica que se puede esperar que la estabilidad a 2-8°C sea comparable a la obtenida para concentraciones de anticuerpos de 106 mg/ml y 145 mg/ml, como se ha explicado anteriormente.

20 Además, el anticuerpo es estable durante al menos 10 ciclos de congelación/descongelación a -80°C ± 10°C en ambas concentraciones probadas de anticuerpos de aproximadamente 106 mg/ml y aproximadamente 145 mg/ml.

Por último, el estudio de estabilidad de agitación se configuró durante un período de tiempo de 14 días en un agitador vertical a +5°C ± 3°C frente a un agitador de control. Durante este período no se pudieron detectar tendencias sobre parámetros para evaluar el pH, la osmolalidad, la degradación, la agregación, la fragmentación, la concentración o la potencia. La agitación parece no tener ningún impacto en la estabilidad de los anticuerpos.

Sobre la base de los datos anteriores, se puede proponer una vida útil de al menos 60 meses para concentraciones de hasta aproximadamente 171 mg/ml a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Ejemplo 13: Evaluación de la viscosidad

- 5 La viscosidad se determinó con un reómetro. Se utilizó un reómetro para los fluidos que no podían definirse por un único valor de viscosidad y, por lo tanto, que requerían que se establecieran y midieran más parámetros que los de un viscosímetro.

- 10 Para algunos fluidos, la viscosidad es una constante respecto a una amplia gama de velocidades de cizallamiento (fluidos newtonianos). Los fluidos sin una viscosidad constante (fluidos no newtonianos) no pueden describirse por un único número. Los fluidos no newtonianos exhiben una variedad de diferentes correlaciones entre la tensión de cizallamiento y la tasa de cizallamiento. Por lo tanto, la viscosidad depende de la temperatura, así como de la velocidad de cizallamiento de los fluidos no newtonianos. La viscosidad se indica en mili Pascal * segundos (mPas*s) a una temperatura determinada y a una velocidad de cizallamiento determinada y [1/s].

La viscosidad de la formulación con aproximadamente 150 mg/ml de anticuerpo es inferior a 12 mPas*s a una velocidad de cizallamiento entre 50 y aproximadamente 1000 [1/s] a una temperatura de 20°C .

- 15 La viscosidad de la formulación con aproximadamente 150 mg/ml de anticuerpo es inferior a 20 mPas*s a una velocidad de cizallamiento entre 50 y aproximadamente 1000 [1/s] a una temperatura de 5°C .

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Amgen Research (Munich) GmbH; Takeda GmbH
- 5 <120> Formulaci3n l3quida que comprende un compuesto neutralizante del GM-CSF
 <130> MIM14487PCT
 <150> US61/720,892
 <151> 31-10-2012
- 10 <150> EP12199191.3
 <151> 21-12-2012
 <160> 56
- 15 <170> PatentIn versi3n 3.5
 <210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR-H3 7A-701
- 25 <400> 1
 Ser Gly Leu Ile Ala Asn His Met Thr Pro
 1 5 10
- 30 <210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR-H3 7B1-502
- 35 <400> 2
 Thr Thr Leu Ile Ser Val Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10
- 40 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
- 45 <220>
 <223> CDR-H3 L38-A1
 <400> 3
 Ser Gly Leu Ile Phe Asp Tyr Trp Leu Asp
 1 5 10
- 50 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
- 55 <220>
 <223> CDR-H3 L38-A12
 <400> 4

Ser Gly Leu Ile Ile Asp Ala Leu Ser Pro
1 5 10

5 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> CDR-H3 L38-G7

<400> 5
Thr Ser Leu Met Ser Ile Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

15 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> CDR-H3 L39-D11

<400> 6
Ser Gly Leu Leu Phe Leu Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

25 <210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> CDR-H3 E1-37-E7

<400> 7
Ser Gly Leu Ile Asn Leu Gly Met His Pro
1 5 10

35 <210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

40 <220>
 <223> CDR-H3 M1_3-82

<400> 8
Ser Gly Leu Ile Phe Asp Ala Leu Arg Asp
1 5 10

45 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

50 <220>
 <223> CDR-H3 Ln4p-23

55 <400> 9
Ser Gly Leu Ile Phe Asp Lys Leu Thr Ser
1 5 10

<213> secuencia artificial

<220>
<223> CDR-H2 7B1-502

5 <400> 15
Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

10 <210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> CDR-L1 5-306

<400> 16
Arg Ala Ser Gln Asn Ile Arg Asn Ile Leu Asn
1 5 10

20 <210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

25 <220>
 <223> CDR-L2 5-306

<400> 17
Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

30 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <223> CDR-L3 5-306

<400> 18
Gln Gln Ser Tyr Ser Met Pro Arg Thr
1 5

40 <210> 19
 <211> 107
 <212> PRT

45 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> VL 5-306* L-versión

50 <400> 19

ES 2 794 449 T3

```

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

```

5 <210> 20
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> VH con CDR-H3 = 7A-701

<400> 20

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
20          25          30

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

```

15 <210> 21
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> VH con CDR-H3 = 7B1-502*

<400> 21

```

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

```

25 <210> 22
 <211> 119
 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> VH con CDR-H3 = 3077*

5

<400> 22

```

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

      85      90      95
Thr Arg Ser Gly Leu Ile Ala Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
      100      105      110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser
      115
    
```

<210> 23

10 <211> 119

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> VH con CDR-H3 = L38-A1

<400> 23

```

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

<210> 24

20 <211> 119

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> VH with CDR-H3 = L38-A12

<400> 24

ES 2 794 449 T3

```

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

```

5 <210> 25
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> VH con CDR-H3 = L38-G7

10 <400> 25

```

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

```

15 <210> 26
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> VH con CDR-H3 = L39-D11

20 <400> 26

```

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

```

25 <210> 27
 <211> 119

<212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 5 <223> VH con CDR-H3 = E1-37-E7

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

10 <210> 28
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> VH con CDR-H3 = M1_3-82

<400> 28
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Leu Ile Phe Asp Ala Leu Arg Asp Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

20 <210> 29
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

25 <220>
 <223> VH con CDR-H3 = Ln4p-23

<400> 29
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

30

ES 2 794 449 T3

```

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

```

5 <210> 30
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> VH con CDR-H3 = Ln4p-28

<400> 30

```

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

```

15 <210> 31
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> VH con CDR-H3 = Ln4p-50

<400> 31

```

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

```

25 <210> 32
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> VH con CDR-H3 = Ln4p-65

<400> 32

ES 2 794 449 T3

```

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

```

<210> 33

<211> 119

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> VH con CDR-H3 = Ln4p-90

10

<400> 33

```

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

```

<210> 34

15 <211> 214

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

20 <223> Cadena ligera 5-306* L-versión

<400> 34

```

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

```

<210> 35

<211> 449

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada con CDR-H3 = 7B1-502*

10

<400> 35

```

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

```

```

100      105      110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115      120      125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130      135      140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145      150      155      160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165      170      175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180      185      190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195      200      205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210      215      220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225      230      235      240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245      250      255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260      265      270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275      280      285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290      295      300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305      310      315      320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325      330      335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340      345      350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355      360      365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370      375      380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385      390      395      400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405      410      415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420      425      430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435      440      445
Lys

```

<210> 36
 <211> 449
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena pesada con CDR-H3 =7A-701*

10 <400> 36
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser Gly Leu Ile Ala Asn His Met Thr Pro Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 37
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cadena pesada con CDR-H3 = L38-A1*

10

<400> 37

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Leu Ile Phe Asp Tyr Trp Leu Asp Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 38
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5

<220>

<223> Cadena pesada con CDR-H3 = L38-A12*

<400> 38

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
20
Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
35      40      45
Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50      55      60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85      90      95
Ala Arg Ser Gly Leu Ile Ile Asp Ala Leu Ser Pro Trp Gly Gln Gly
100     105     110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115     120     125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130     135     140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145     150     155     160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165     170     175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180     185     190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195     200     205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210     215     220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225     230     235     240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245     250     255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260     265     270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275     280     285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290     295     300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305     310     315     320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325     330     335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340     345     350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355     360     365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370     375     380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385     390     395     400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405     410     415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420     425     430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435     440     445

```

Lys

5

<210> 39

<211> 449

<212> PRT

10 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada con CDR-H3 = L38-G7*

5

<400> 39

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
20      25      30
Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
35      40      45
Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50      55      60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85      90      95
Thr Arg Thr Ser Leu Met Ser Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100     105     110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115     120     125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130     135     140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145     150     155     160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165     170     175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180     185     190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195     200     205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210     215     220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225     230     235     240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245     250     255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260     265     270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275     280     285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290     295     300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305     310     315     320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325     330     335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340     345     350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355     360     365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370     375     380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385     390     395     400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405     410     415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420     425     430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435     440     445
Lys
    
```

<210> 40

<211> 449

<212> PRT

<213> secuencia artificial

10

<220>

<223> Cadena pesada con CDR-H3 = L39-D11*

5 <400> 40

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
20      25      30
Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
35      40      45
Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50      55      60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85      90      95
Thr Arg Ser Gly Leu Leu Phe Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100     105     110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115     120     125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130     135     140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145     150     155     160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165     170     175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180     185     190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195     200     205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210     215     220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225     230     235     240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245     250     255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260     265     270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275     280     285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290     295     300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305     310     315     320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325     330     335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340     345     350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355     360     365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370     375     380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385     390     395     400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405     410     415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420     425     430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435     440     445
Lys

```

<210> 41

ES 2 794 449 T3

<211> 449
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cadena pesada con CDR-H3 = E1-37-E7*

<400> 41

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

```

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
  275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
  290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
  305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
  325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
  340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
  355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
  370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
  385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
  405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
  420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
  435 440 445
Lys

```

<210> 42
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena pesada con CDR-H3 = M1_3-82*

```

<400> 42
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
  1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
  20 25 30
Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
  35 40 45
Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
  50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
  65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
  85 90 95
Ala Arg Ser Gly Leu Ile Phe Asp Ala Leu Arg Asp Trp Gly Gln Gly
  100 105 110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
  115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
  130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
  145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
  165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
  180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
  195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

```

ES 2 794 449 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 210 | | | | | | 215 | | | | | | | | 220 | |
| Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser |
| | | | | 245 | | | | | | 250 | | | | | 255 |
| Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp |
| | | | 260 | | | | | | 265 | | | | | 270 | |
| Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn |
| | | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | |
| Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | | 300 | | | |
| Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 |
| Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | |
| Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr |
| | | | 340 | | | | | | 345 | | | | | 350 | |
| Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | | 365 | | |
| Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | |
| Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu |
| 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 |
| Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys |
| | | | | 405 | | | | | | 410 | | | | 415 | |
| Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu |
| | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | |
| Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly |
| | | 435 | | | | | 440 | | | | | | 445 | | |
| Lys | | | | | | | | | | | | | | | |

<210> 43
 <211> 449
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena pesada con CDR-H3 = Ln4p-23*

10 <400> 43

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

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 44
 <211> 449
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena pesada con CDR-H3 = Ln4p-28*

10 <400> 44
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Leu Ile Asn Leu His Phe Asp Thr Trp Gly Gln Gly

```

100                               105                               110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115                               120                               125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130                               135                               140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                               150                               155
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165                               170                               175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180                               185                               190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195                               200                               205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210                               215                               220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                               230                               235
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245                               250                               255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260                               265                               270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275                               280                               285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290                               295                               300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                               310                               315
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325                               330                               335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340                               345                               350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355                               360                               365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370                               375                               380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                               390                               395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405                               410                               415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420                               425                               430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435                               440                               445
Lys

```

<210> 45
 <211> 449
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena pesada con CDR-H3 = Ln4p-50*

10 <400> 45

```

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

```

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Ser Thr His Phe Ser Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445
Lys

<210> 46
<211> 449
5 <212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
10 <223> Cadena pesada con CDR-H3 = Ln4p-65*

<400> 46

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Gly Leu Ile Met Asp Lys Leu Asp Asn Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445
Lys

<210> 47
<211> 449
<212> PRT
<213> secuencia artificial

5

<220>

<223> Cadena pesada con CDR-H3 = Ln4p-90*

<400> 47

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
20
Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
35      40      45
Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50      55      60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85      90      95
Ala Arg Ser Gly Leu Ile Ile Asp Asn Leu Asn Pro Trp Gly Gln Gly
100      105      110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115      120      125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130      135      140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145      150      155      160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165      170      175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180      185      190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195      200      205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210      215      220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225      230      235      240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245      250      255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260      265      270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275      280      285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290      295      300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305      310      315      320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325      330      335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340      345      350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355      360      365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370      375      380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385      390      395      400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405      410      415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420      425      430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

```

5

<210> 48

<211> 449

<212> PRT

<213> secuencia artificial

10

<220>

<223> Cadena pesada con CDR-H3 = 3077*

<400> 48

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser Gly Leu Ile Ala Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

5

<210> 49

<211> 127

<212> PRT

<213> GM-CSF humano

10

<400> 49

```

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

<210> 50

<211> 127

<212> PRT

<213> GM-CSF macaca

<400> 50

```

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

<210> 51

<211> 127

<212> PRT

<213> GM-CSF de gibón

<400> 51

```

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

<210> 52
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> VH con CDR-H3 7B1-502

<400> 52
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Thr Thr Leu Ile Ser Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

10

<210> 53
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

15

<220>
 <223> VH con CDR-H3 3077

20

<400> 53
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser Gly Leu Ile Ala Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

25

<210> 54
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

30

<220>
 <223> VL 5-306

<400> 54

ES 2 794 449 T3

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

<210> 55

<211> 107

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> VL 5-306* V-versión

10

<400> 55

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

15 <210> 56

<211> 10

<212> PRT

<213> secuencia artificial

20 <220>

<223> CDR-H3 3077

<400> 56

Ser Gly Leu Ile Ala Val Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

25

REIVINDICACIONES

1. Una composición acuosa que comprende:
 - i) un compuesto neutralizante de GM-CSF que es un anticuerpo monoclonal humano que se une a GM-CSF que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO. 34 y una secuencia de aminoácidos de cadena pesada como se establece en SEQ ID NO: 35, a una concentración de 100 mg / ml a 180 mg / ml,
 - ii) 5% (p/v) de sorbitol,
 - iii) L-histidina 30 mM y
 - iv) tiene un pH de 5,8.
- 10 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que está libre de tensioactivos u otros aminoácidos.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende 150 mg / ml del anticuerpo que se une al GM-CSF.
4. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es estable durante al menos 24 meses a aproximadamente 2-8°C o al menos 28 días a temperatura ambiente.
- 15 5. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para uso en terapia.
6. La composición para uso según la reivindicación 5, en la que la composición se administra por vía intravenosa y / o subcutánea.
7. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6 en el tratamiento de trastornos inflamatorios y autoinmunes.
- 20 8. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que los trastornos se seleccionan de trastornos alérgicos, psoriásicos, artríticos y asmáticos.

Figura 1

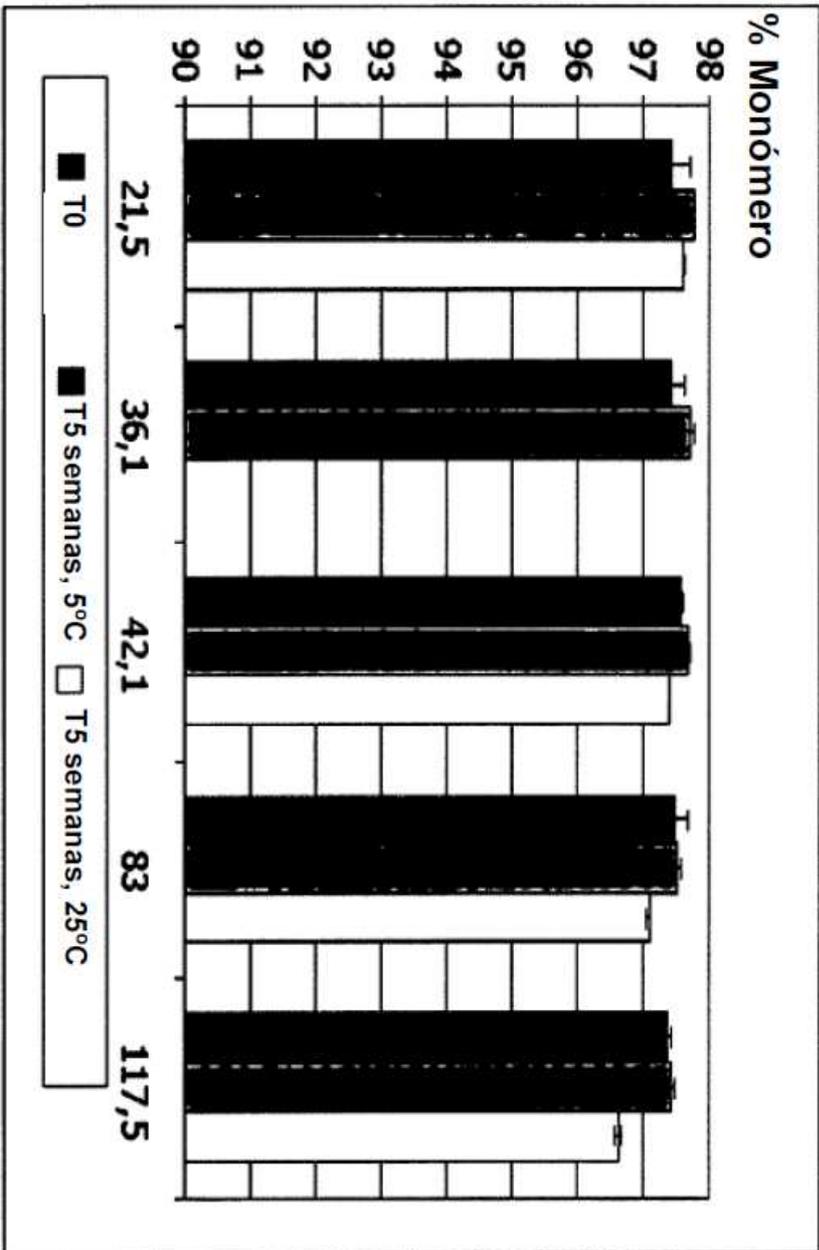


Figura 2

