



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 271 515**

(51) Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 38/48** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

**A61K 38/48** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

(12)

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03388016 .2**

(86) Fecha de presentación : **14.03.2003**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1344533**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **17.09.2003**

(54) Título: **Composiciones farmacéuticas que comprenden lectina de unión a manosa.**

(30) Prioridad: **15.03.2002 DK 2002 00414**

(73) Titular/es: **Natimmune A/S  
Fruebjergvej 3  
2100 Kobenhavn O, DK**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2007**

(72) Inventor/es: **Larsen, Jesper Lund y  
Kongerslev, Leif**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2007**

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Composiciones farmacéuticas que comprenden lectina de unión a manosa.

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden lectina de unión a manosa. Además, la invención se refiere al tratamiento de un estado clínico usando dichas composiciones farmacéuticas y al uso de las composiciones farmacéuticas para la preparación de un medicamento.

**10 Fundamento de la invención**

La MBL es una proteína de la familia colectina y se caracteriza por una estructura oligomérica de subunidades. Cada subunidad consiste en 3 polipéptidos idénticos consistente cada uno en un dominio de reconocimiento de hidratos de carbono tipo C, dependiente de calcio (CRD), incorporado a una barra de colágeno.

El número de subunidades en una molécula de MBL es variable (Lipscombe RJ *et al.*, 1995), pero se ha sugerido que el polipéptido activo biológicamente es un oligómero consistente en más de tres subunidades. La MBL de origen natural en plasma comprende principalmente oligómeros de más de tres subunidades, y además la proteína desnaturalizada e impedida estructuralmente forma interlineados a bandas en por ejemplo geles de SDS entre las bandas de MBL dominantes correspondientes a los oligómeros superiores.

La MBL producida recombinantemente revela una variación de oligómeros similar a MBL derivada de plasma (Vorup-Jensen T *et al.*, 2001). Sin embargo, la MBL producida recombinantemente tiene usualmente un mayor contenido de formas de masa baja que la MBL derivada de plasma. Las formas de masa baja de MBL incluyen por ejemplo cadenas de polipéptido sencillas, subunidades sencillas y subunidades dímeras.

La MBL está relacionada estructuralmente con el subcomponente C1q del componente C1 de complemento, y aparece que la MBL activa el sistema de complemento mediante la serina proteasa asociada denominada MASPs (Matsushita M., 1992) o p100 (Ji, Y-H. *et al.*, 1993), que son similares a los componentes C1r y C1s de la trayectoria clásica. La trayectoria de activación del complemento de MBL se denomina trayectoria de MBlectina. Según el mecanismo postulado por esta trayectoria, la MBL se une a estructuras de hidratos de carbono específicas encontradas en la superficie de un grupo de microorganismos que incluyen bacterias, levadura, protozoos parásitos y virus (Turner, M.W, 1996), y su actividad antimicrobiana resulta de la activación de los componentes de la trayectoria de complemento líticos terminales (Kawasaki, N. *et al.*, 1989) o promoviendo fagocitosis (Kuhlman, M *et al.*, 1989).

Según se ha indicado, el nivel de MBL en plasma puede determinarse genéticamente (Sumiya, M *et al.*, 1991, Lipscombe, R.J. *et al.*, 1992, Madsen H.O. *et al.*, 1994). La deficiencia de MBL está asociada con susceptibilidad a infecciones frecuentes con una variedad de microorganismos en la niñez (Super, M *et al.*, 1989, Garred, P. *et al.*, 1995) y posiblemente en adultos (Garred, P. *et al.*, 1995, Summerfield, J.A. *et al.*, 1995). Una información reciente asocia la deficiencia de MBL con infección por VIH y con una muerte más rápida tras el desarrollo de SIDA (Nielsen, S.L. *et al.*, 1995, Garred, P *et al.*, 1997). La MBL se une a la forma de galactosilo a de IgG (GO), que se encuentra en concentraciones elevadas en pacientes con artritis reumatoide, y activa después el complemento (Malhotra, R *et al.*, 1995). La deficiencia de MBL está asociada también con una predisposición a abortos espontáneos recurrentes (Kilpatrick, D.C. *et al.*, 1995) y también al desarrollo de lupus eritematoso sistémico (Davies, E.J *et al.*, 1995).

La MASP-1 (serina proteasa asociada a MBL 1) es una serina proteasa de estructura similar a C1r y C1s de la trayectoria de complemento, aunque tiene una estructura de lazo de histidina del tipo encontrado en serina proteasas de tripsina y de tipo tripsina. Se ha encontrado que la MASP-1 está implicada en la activación de complemento por MBL. Se ha indicado que un clón de cADN que codifica MASP-1 codifica un péptido líder putativo de 19 aminoácidos seguidos por 680 residuos de aminoácidos que se predice que forme el péptido maduro.

La MASP-2 (serina proteasa asociada a MBL 2) (Thiel, S. *et al.*, 1997) es una serina proteasa de estructura similar a C1r y C1s de la trayectoria de complemento. Como éstas, y al contrario que MASP-1, no tiene la estructura de lazo de histidina del tipo encontrado en serina proteasas de tripsina y de tipo tripsina. Se ha encontrado que la MASP-2 está implicada en la activación de complemento por MBL. La MASP-3 muestra alguna homología con MASP-1 y MASP-2 y las dos serina proteasas asociadas con C1q, C1r y C1s.

La MBL purificada de suero se ha usado previamente en una formulación farmacéutica que contiene además albúmina de suero humano para tratar dos individuos deficientes en MBL y dicho tratamiento con MBL produjo una reducción significativa de infecciones (Valdimarsson *et al.*, 1998). Además, se han descrito en la técnica anterior otras formulaciones farmacéuticas de MBL diversas.

Valdimarsson *et al.* describen la infusión de una solución que contiene 200 µg/ml de MBL en NaCl 0,15 M y 1% p/v (= 10 ng/ml) de albúmina de suero humano.

El documento US 5.270.199 describe una formulación de MBL que comprende de 5 a 100 µg/ml de MBL y/o fragmento de MBL.

# ES 2 271 515 T3

El documento WO 99/64453 describe diversas formulaciones de MBL que comprenden MBL y un agente estabilizante. Como ejemplo preferido se menciona una formulación que comprende de 300 a 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS con 0,5% p/v de albúmina (= 5 mg/ml).

5 Se describen composiciones farmacéuticas que comprenden 250-500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de MBL con 0,5% de albúmina en Laursen, I (2001) Downstream PPB Abstracts (Amersham Bioscience) páginas 15-17..

Sin embargo, estas formulaciones de MBL comprenden bajas cantidades de MBL y/o alta concentración de otras proteínas.

## 10 **Sumario de la invención**

Sin embargo, hay necesidad de formulaciones de MBL, que comprendan MBL estable, en particular formulaciones tales que comprendan cantidades reducidas de estabilizantes que contengan proteína, tales como, por ejemplo, 15 cantidades reducidas de albúmina de suero humano.

Casi todas las formulaciones farmacéuticas que comprenden proteínas o polipéptidos como ingrediente activo comprenden también uno o más estabilizantes de dicha proteína o polipéptido. En particular, dichos estabilizantes pueden ser detergentes o estabilizantes que contienen proteína. No obstante, para muchos fines, es deseable omitir o reducir 20 la cantidad de diferentes aditivos, tales como estabilizantes para uso en formulaciones farmacéuticas, en particular la cantidad de estabilizantes que contienen proteína, sin embargo, frecuentemente una reducción de estabilizantes que contienen proteína produce una estabilidad reducida del componente proteínico activo.

Los inventores han desarrollado métodos para producir MBL altamente concentrada y, sorprendentemente, los 25 inventores han mostrado que formulaciones de MBL que comprenden altas concentraciones de MBL pueden ser suficientemente estables para usarse en formulaciones farmacéuticas, incluso si no se añade o se añade sólo una cantidad reducida de estabilizante que contiene proteína.

Por consiguiente, un primer objetivo de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que 30 comprenden aditivos aceptables farmacéuticamente y

a) al menos 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de material que contiene proteína, en el que lectina de unión a mannan (MBL) y/o variantes de MBL constituyen al menos el 35% (p/p) de la proteína total; o

35 b) al menos 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de lectina de unión a mannan (MBL) y/o variantes de MBL.

Un segundo objetivo de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden aditivos aceptables farmacéuticamente, y lectina de unión a mannan (MBL) y/o variantes de MBL, y al menos un catión divalente.

40 Un tercer objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para preparar dichas composiciones farmacéuticas, que comprende las etapas de

a) Proporcionar lectina de unión a mannan (MBL) y/o variantes de MBL.

45 b) Mezclar dichas MBL y/o variantes de MBL con aditivos aceptables farmacéuticamente y opcionalmente con cationes divalentes

c) Y obtener por ello dichas composiciones farmacéuticas.

50 Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar tratamiento de un estado clínico en un individuo que lo necesite, que comprende administrar dichas composiciones farmacéuticas. El tratamiento puede seleccionarse del grupo constituido por tratamiento curativo, de mejora, de alivio y preventivo y tratamiento suplementario.

55 Es todavía un objetivo adicional de la presente invención proporcionar el uso de la composición mencionada antes, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un estado clínico en un individuo que lo necesite.

Es además un objetivo de la presente invención proporcionar un medicamento de uso en el tratamiento de un estado clínico en un individuo que lo necesite que comprende una composición como se ha descrito antes.

60 Es además un objetivo de la presente invención proporcionar usos de dichas composiciones farmacéuticas con fines de diagnóstico.

## 65 **Descripción breve de las figuras**

La Figura 1 ilustra los datos de activación de C4 para muestras de formulación de 1 mg/ml de MBL guardadas 12 meses a +4 y -20°C en comparación con MBL de referencia.

# ES 2 271 515 T3

La Figura 2 ilustra los cromatogramas SEC del patrón de referencia arriba seguido por una muestra de estabilidad de 1 mg/ml mantenida a +4°C y a -20°C. Se detecta un pequeño pico frontal en la muestra mantenida enfriada correspondiente al 1% del contenido de MBL total. La Figura 3 ilustra datos de espectrometría de masas. Picos similares para la referencia y las muestras de MBL de 12 meses indican que no hay cambios en la cadena de polipéptido de MBL durante el almacenamiento.

5

## Descripción breve del listado de secuencias

10 SEQ ID NO: 1: Secuencia de proteína de MBL humana

SEQ ID NO: 2: Secuencia de proteína de MASP-1 humana

15 SEQ ID NO: 3: Secuencia de proteína de MASP-2 humana

SEQ ID NO: 4: Secuencia de proteína de MASP-3 humana

## Descripción detallada de la invención

### *MBL y variantes de MBL*

20 La presente invención proporciona entre otras composiciones farmacéuticas que comprenden MBL y/o variantes de MBL. Las composiciones farmacéuticas deben comprender en general una alta concentración de MBL. Por ejemplo, la composición puede comprender al menos 200 µg/ml, como mínimo 300 µg/ml, tal como al menos 500 µg/ml, por ejemplo como mínimo 750 µg/ml, tal como al menos 1.000 µg/ml, por ejemplo al menos 1.300 µg/ml de MBL y/o variantes de MBL.

25 Por consiguiente, la composición puede comprender en el intervalo de 200 a 10.000 µg/ml, tal como de 200 a 5.000 µg/ml, por ejemplo de 200 a 3.000 µg/ml, tal como de 200 a 2.000 µg/ml, por ejemplo de 200 a 1.500 µg/ml de MBL y/o variantes de MBL.

30 En realizaciones de la presente invención en las que las composiciones farmacéuticas comprenden un catión divalente, se prefiere que dichas composiciones comprendan al menos 300 µg/ml, tal como al menos 500 µg/ml, por ejemplo al menos 750 µg/ml, tal como al menos 1.000 µg/ml, tal como al menos 1.500 µg/ml, por ejemplo al menos 2.000 µg/ml, tal como al menos 2.500 µg/ml, por ejemplo al menos 3.000 µg/ml, tal como al menos 3.500 µg/ml, por ejemplo al menos 4.000 µg/ml, tal como al menos 5.000 µg/ml, por ejemplo al menos 6.000 µg/ml, tal como al menos 7.000 µg/ml, por ejemplo al menos 8.000 µg/ml, tal como al menos 9.000 µg/ml, por ejemplo al menos 10.000 µg/ml de MBL y/o variantes de MBL.

35 La concentración de MBL debe determinarse en general determinando y/o calculando el peso de los aminoácidos que constituyen MBL. En general, se calcula el peso que corresponda a la forma no glicosilada de MBL. Por ello, en general, el peso de MBL no incluye ninguna glicosilación y no incluye el contenido de agua. En una realización, la concentración de MBL puede determinarse usando un análisis de aminoácidos como se describe aquí seguidamente.

### 40 Estimación de la concentración de MBL por análisis de aminoácidos:

45 No todos los aminoácidos pueden estimarse en un análisis de aminoácidos, sin embargo, usualmente puede estimarse fácilmente la masa de los aminoácidos no detectables a partir de la composición de los aminoácidos detectados cuando se determina la concentración de una solución de MBL pura o bastante pura.

50 La estimación de la concentración de MBL puede realizarse según un cierto número de métodos diferentes. Preferiblemente, puede emplearse uno de los dos métodos descritos aquí después, más preferiblemente puede emplearse el método 2 descrito aquí después.

55 La cantidad de hidrato de carbono no se estima habitualmente, es decir, la concentración de proteína indicada representará sólo usualmente el contenido de péptido solo. Sin embargo, es posible determinar la masa total de péptido + hidrato de carbono a partir de la cantidad de aminoácidos.

### 60 Aminoácidos no detectables:

Cuando se estima MBL, los aminoácidos no detectables son

- Triptófano (Trp se hidroliza en ácido); están presentes 3 Trp en la cadena de polipéptido
- Histidina (His se coelujo con Tris); sólo está presente un His en la cadena de polipéptido
- Hidroxilisina (Hyl no se aplica durante la calibración); pueden estar presentes 4 Hyl como máximo en la cadena de polipéptido

## ES 2 271 515 T3

- Hidroxiprolina (Hyp), están presentes 8 como máximo, típicamente 4, Hyp en la cadena de polipéptido.

Son aminoácidos detectables, pero estimados inciertamente

5 • Lisina (Lys se hidroxila parcialmente): están presentes 15-19 Lys en la cadena de polipéptido; pueden hidroxilarse 4 Lys como máximo

10 • Prolina (Pro se hidroxila parcialmente); están presentes 10-18 Pro en la cadena de polipéptido; pueden hidroxilarse 8 Pro como máximo.

10 Método 1

Moles de aminoácidos detectables y moles de aminoácidos no detectables en la muestra analizada:

15 Aminoácidos no detectables = Trp, His, Hyp e Hyl: se supone que están presentes como media 4 Hyp, 4 Hyl, 14 Pro y 15 Lys.

$$\text{Moles no detectados} = [\text{Trp}] + [\text{His}] + [\text{Hyp}] + [\text{Hyl}] = 3 + 1 + 4 + 4 = 12$$

20

Factor de corrección para moles no detectados = Todos los moles/moles detectados

$$= \text{Todos los moles}/(\text{Todos los moles} - \text{Moles no detectados}) = 228/(228-12) = 1,0556$$

25 Aminoácidos no detectables = Trp, His, Hyp e Hyl:

30

Masa no detectada =  $[\text{MTrp}] + [\text{MHis}] + [\text{MHyp}] + [\text{MHyl}] =$

$$3 * 186,21 + 1 * 137,14 + 4 * 113,11 + 4 * 144,17 = 1725,89$$

35

Masa detectada =

40 [MASx] + [MThr] + [MSer] + [MGlx] + [MPro] + [MGly] + [MAla] + [MCys] + [MVal] + [M

Met] + [Mlle] + [MLEu] + [MTyr] + [MPhe] + [MLys] + [MArg] =

$$25 * 115,09 + 15 * 101,11 + 13 * 87,08 + 27 * 129,12 + 14 * 97,12 + 31 * 57,05 + 16 * 71,08 + 7 * 103,1$$

45

$$5 + 10 * 99,13 + 2 * 131,20 + 8 * 113,16 + 17 * 113,16 + 1 * 163,18 + 9 * 147,18 + 15 * 128,17 + 6 * 156,$$

$$19 = 22429,93$$

50

Factor de corrección para masa no detectada = Toda la masa/Masa

$$\text{detectada} = (\text{Masa detectada} + \text{Masa no detectada})/\text{Masa detectada} = 1,0769$$

55 Método 2

Amoniáculos no detectables = Trp, His, Pro/Hyp y Lys/Hyl: Se supone que están presentes como media 4 Hyp, 4 Hyl, 14 Pro y 15 Lys.

60

$$\text{Moles no detectados} = [\text{Trp}] + [\text{His}] + [\text{Pro/Hyp}] + [\text{Lys/Hyl}] = 3 + 1 + 18 + 19 = 41$$

65

Factor de corrección para moles no detectados = Todos los moles/Moles detectados

$$= \text{Todos los moles}/(\text{Todos los moles} - \text{Moles no detectados}) = 228/(228-41) = 1,2193$$

# ES 2 271 515 T3

Masa de aminoácidos detectables y masa de aminoácidos no detectables en la muestra analizada:

Para cada aminoácido, se estima la masa como moles por masa molar (corregido para el péptido perdido unido a agua). Por ejemplo, [MThr] = [Thr]\*(119,12-18,01) = [Thr]\*101,11.

5

Aminoácidos no detectables = Trp, His, Pro/Hyp y Lys/Hyl:

10 **Masa no detectada = [MTrp]+[MHis]+[Mpro]+[MHyp]+[MLys]+[MHyl] =**  
**3\*186,21+1\*137,18+97,12+19\*128,17 = 4879,16**

15 **Masa detectada =**

20 **[M Asx]+[MThr]+[MSer]+[MGlx]+[MGly]+[MAla]+[MCys]+[MVal]+**  
**[MMet]+[Mile]+[MLEu]+[MTyr]+[MPhe]+[MArg] =**  
**25\*115,09+15\*101,11+13\*87,08+27\*129,12+31\*57,05+16\*71,08+7\*103,15+**  
**10\*99,13+2\*131,20+8\*113,16+17\*113,16+1\*163,18+9\*147,18+6\*156,19 =**  
25 **19147,70**

30 **Factor de corrección para masa no detectada = Toda la masa/Masa**  
**detectada = (Masa detectada+Masa no detectada)/Masa detectada = 1,2548**

35 Comparación del Método 1 y el Método 2 de evaluación

El Método 1 se basa en estimaciones de aproximadamente el 95% de los aminoácidos, mientras que el Método 2 se basa en estimaciones de sólo aproximadamente el 75% de los aminoácidos.

40 En general, todas las estimaciones del contenido de aminoácidos realizadas se calculan por ambos métodos, y no se observa habitualmente una diferencia de resultados significativa. El Método 2 no hace suposiciones sobre el contenido de Hyl e Hyp, y se prefiere por tanto.

45 Para ciertos fines, la concentración de MBL se da en molar en lugar de como peso/volumen. Puesto que la MBL puede estar presente como un oligómero que comprende diferentes cantidades de subunidades, es difícil definir 1 mol de MBL. Dentro del alcance de la presente invención, se prefiere que 1 mol de MBL se refiera a 1 mol de cadenas de polipéptido de MBL individual. Dichas cadenas de polipéptido de MBL individual pueden ser no glicosiladas, parcialmente glicosiladas o totalmente glicosiladas. Se prefiere que la molaridad de MBL se calcule contando con que la MBL no está glicosilada.

50 El peso molecular de las cadenas de polipéptido de MBL individual no glicosilada es 24.800 Da. El peso molecular de cadenas de polipéptido de MBL individual totalmente glicosilada es 25.900 Da. El peso molecular de la forma que tiene lugar más comúnmente de cadenas de polipéptido de MBL individual glicosilada es 25.500 Da.

55 Por ello, dependiendo del estado de glicosilación de MBL, 1 mg/ml de MBL corresponde al intervalo de 38 a 41  $\mu$ M, preferiblemente al intervalo de 38,6 a 40,3  $\mu$ M. Para muchas aplicaciones prácticas, 1 mg/ml de MBL corresponde a aproximadamente 39,2  $\mu$ M. Sin embargo, 1 mg/ml de MBL no glicosilada corresponde a aproximadamente 40,3  $\mu$ M, mientras que 1 mg/ml de MBL totalmente glicosilada corresponde a aproximadamente 38,6  $\mu$ M.

60 Los cálculos anteriores se refieren a la MBL de SEQ ID No. 1.

No obstante, es evidente que pueden adaptarse los métodos para estimar la concentración de fragmentos y/o variantes de MBL.

65 Para muchas fines, es deseable que la composición farmacéutica comprenda una cantidad reducida de proteínas distintas de MBL (véase aquí después).

## ES 2 271 515 T3

Por consiguiente, se prefieren composiciones farmacéuticas en las que MBL o variantes de MBL constituyan al menos el 35% (p/p), tal como al menos 40% (p/p), por ejemplo al menos 50% (p/p), tal como al menos 60% (p/p), por ejemplo al menos 70% (p/p), tal como al menos 80% (p/p), por ejemplo al menos 90% (p/p), tal como al menos 95% (p/p), por ejemplo al menos 98% (p/p), tal como al menos 99% (p/p), por ejemplo al menos 99,5% (p/p), tal como al menos 99,8% (p/p) de la proteína total.

En una realización de la invención, la MBL constituye esencialmente toda la proteína total. La expresión “esencialmente toda” se entiende que abarca “toda la detectable”, preferiblemente toda la proteína detectable por coloración con azul brillante coomassie.

En otra realización, la composición farmacéutica puede comprender aditivos proteínas usados comúnmente, por ejemplo proteínas que actúan como estabilizantes o estabilizantes que contienen proteína. Las proteínas útiles como estabilizantes incluyen por ejemplo albúmina de suero humano u otras clases de albúmina de suero. Además, pueden proporcionarse estabilizantes que contienen proteína en suero humano crudo o fracciones del mismo.

Es importante en general para la estabilidad de formulaciones farmacéuticas que contienen proteína que comprendan una concentración adecuada de proteínas. En general, si la concentración de la proteína de interés es baja, hay un riesgo significativo de adhesión no específica de la proteína de interés a superficies de un recipiente de almacenamiento o similar. Además, las interacciones proteína-proteína estabilizan la estructura tridimensional de proteínas y una concentración de proteína más alta puede reducir por tanto la desnaturalización. Por otra parte, las soluciones de proteína que comprenden una alta concentración de la proteína de interés son en general no estables, porque puede tener lugar la agregación de dicha proteína a una velocidad más rápida (Frokjaer y Hovgaard, pág. 102, Wang, 1999). Para superar los problemas mencionados antes, es común por tanto añadir estabilizantes, por ejemplo estabilizantes que contienen proteína, tales como albúmina (Akers *et al.*, 2000, págs. 166-167) o por ejemplo detergentes para formulaciones farmacéuticas que comprenden proteínas.

No es siempre deseable sin embargo añadir estabilizantes a una composición farmacéutica. Los estabilizantes usados comúnmente que contienen proteínas tales como albúmina se purifican usualmente a partir de suero, que es indeseable por el riesgo de transferir patógenos del donante del suero. Además, es deseable frecuentemente reducir el número de aditivos añadidos a una composición farmacéutica con el fin de mantener la producción lo más simple posible. Son más fáciles de manejar menos etapas de producción, reducen el coste y reducen también el riesgo de pérdida y degradación de proteína. Por ello, se prefiere frecuentemente no añadir estabilizantes proteína, por ejemplo no añadir estabilizantes que contengan proteína ni detergentes.

Sorprendentemente, en una realización, la presente invención describe una formulación farmacéutica que comprende MBL, en la que dicha composición farmacéutica no comprende ningún estabilizante proteína, es decir, la formulación no comprende otra proteína detectable más que MBL, y la formulación no comprende ningún detergente.

Por ello, en una realización preferida de la invención no obstante, MBL constituye esencialmente toda la proteína total de la composición farmacéutica. En particular, puede preferirse que la composición no comprenda proteínas purificadas de suero o de otras muestras corporales humanas o de animales. Debido al riesgo de transferir virus u otros agentes patógenos del donante, es deseable frecuentemente administrar composiciones farmacéuticas que no comprendan compuestos purificados de suero o de otras muestras corporales humanas o de animales.

Por consiguiente, en una realización preferida de la presente invención, la composición farmacéutica no comprende proteínas o material que contenga proteína purificado de suero o de otras muestras corporales humanas o de animales. En esa realización, se prefiere preparar todo o esencialmente todo el material que contiene proteína usando métodos recombinantes.

En una realización de la presente invención, la MBL o variantes de MBL pueden modificarse para aumentar adicionalmente la estabilidad. Por consiguiente, está contenido dentro de la presente invención que MBL o variantes de MBL puedan PEGilarse, acilarse o modificarse de otras formas para aumentar la vida media de MBL o variantes de MBL *in vivo*.

La expresión MBL y variantes de MBL se entiende que incluye cualquier forma de MBL o cualquier homólogo funcional de la misma. En particular, la MBL y variantes de MBL pueden ser proteínas que comprenden al menos un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID 1 o un homólogo funcional de la misma.

La MBL según la presente invención puede comprender una o más subunidades. Cada subunidad de MBL consiste normalmente en 3 polipéptidos individuales, preferiblemente cada polipéptido individual comprende una secuencia de aminoácidos como se identifica por SEQ ID 1 o un fragmento de la misma de un homólogo funcional de la misma. Por ejemplo, MBL puede ser monómeros, dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros, heptámeros, octámeros, nonámeros, decámeros, 11-meros, 12-meros de subunidades o MBL puede comprender incluso más de 12 subunidades. Preferiblemente, MBL comprende más de dos subunidades.

La MBL a usar con la presente invención puede derivarse de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, la MBL puede ser MBL de origen natural o la MBL puede ser MBL producida recombinantemente. Cuando se usa MBL

producida recombinantemente con la presente invención, se prefiere que dicha MBL producida recombinantemente tenga un perfil de distribución de tamaños que sea similar a MBL de origen natural. Por consiguiente, se prefiere que al menos el 50%, por ejemplo al menos el 70%, tal como al menos el 80%, por ejemplo al menos el 90%, tal como al menos el 95%, por ejemplo al menos el 99% de MBL tenga un peso molecular aparente >200 kDa, cuando se determina por SDS-PAGE no reductor.

Según la invención, la MBL puede ser MBL humana o MBL de otras especies de animales, en las que el sistema inmune a este respecto actúa como el sistema inmune humano, por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, MBL de chimpancés y monos rhesus.

En una realización de la presente invención, la MBL es MBL de suero humano de origen natural purificado. En otra realización de la invención, la MBL se ha producido recombinantemente. Se prefiere que la MBL se haya producido recombinantemente.

Se describen ejemplos de métodos preferidos para producir MBL recombinante en la solicitud PCT WO00/70043. En particular, la MBL recombinante a usar en esta invención puede prepararse como se describe en el ejemplo 1 de la solicitud PCT WO00/70043. En el ejemplo, la MBL recombinante se prepara mediante el uso de un vector de expresión que comprende secuencias del gen *MBL* humano. La MBL también puede producirse como se describe aquí en el siguiente ejemplo 1.

Con el fin de obtener composiciones farmacéuticas que comprendan MBL y/o variante de MBL muy concentradas, puede requerirse concentrar una composición de MBL y/o variante de MBL concentrada. La concentración puede hacerse por cualquier método convencional, por ejemplo, usando un dispositivo de filtración y exponiéndola a fuerza centrífuga. Sin embargo, para concentrar grandes cantidades de proteína, pueden preferirse otros métodos.

La invención se refiere también a las composiciones farmacéuticas que comprenden variantes de MBL y a métodos que usan las mismas. Las variantes de MBL pueden ser por ejemplo homólogos funcionales de MBL (véase por ejemplo aquí posteriormente). El péptido de MBL aislado, incluyendo cualesquiera homólogos funcionales del mismo, puede comprender en una realización al menos 80 residuos de aminoácidos, tal como al menos 100 residuos de aminoácidos, tal como al menos 150 residuos de aminoácidos, tal como al menos 200 residuos de aminoácidos, por ejemplo al menos 220 residuos de aminoácidos, tal como al menos 250 residuos de aminoácidos.

#### *Otras proteínas*

La composición farmacéutica según la invención puede comprender otras proteínas distintas de MBL.

Por ejemplo, la composición puede comprender al menos 300 µg/ml, tal como al menos 500 µg/ml, por ejemplo al menos 750 µg/ml, tal como al menos 1.000 µg/ml, por ejemplo al menos 1.300 µg/ml de proteína total o material que contiene proteína. Por ello, la composición puede comprender por ejemplo en el intervalo de 300 a 3.000 µg/ml, tal como en el intervalo de 500 a 3.000 µg/ml, por ejemplo en el intervalo de 750 a 3.000 µg/ml, tal como en el intervalo de 1.000 a 3.000 µg/ml, por ejemplo en el intervalo de 1.300 a 3.000 µg/ml, tal como en el intervalo de 1.000 a 2.000 µg/ml de proteína total o material que contiene proteína.

Las otras proteínas pueden ser cualesquier proteínas adecuadas. En una realización, la composición farmacéutica puede comprender, aparte de MBL, una o más proteínas asociadas naturalmente con MBL.

Por ello, en una realización la presente invención se refiere a una composición farmacéutica, en la que la proteína total aparte de MBL comprende además una o más serina proteasas asociadas a MBL (MASP) o variantes de las mismas. Por ejemplo, pueden seleccionarse MASP y variantes de MASP del grupo constituido por MASP-1 de SEQ ID NO: 2, MASP-2 de SEQ ID NO: 3, MASP-3 de SEQ ID NO: 4, fragmentos de las mismas y homólogos funcionales de las mismas. Se describen aquí después homólogos funcionales de proteínas MASP.

#### *Composición farmacéutica*

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede formularse en un cierto número de maneras diferentes, dependiendo del propósito para la composición farmacéutica particular.

Por ejemplo, la composición farmacéutica puede formularse de una manera que sea útil para una forma de administración particular. Se describen aquí después formas de administración preferidas.

En una realización, la composición farmacéutica se formula para que sea un líquido. Por ejemplo, la composición puede ser una solución de proteína o la composición puede ser una suspensión de proteína. Dicho líquido puede ser adecuado para administración parenteral, por ejemplo para inyección o infusión.

En realizaciones preferidas de la invención, la composición farmacéutica es adecuada para inyección de bolus, lo que requiere que la concentración de MBL sea lo suficientemente alta para que pueda contenerse en un volumen una dosificación de MBL adecuada (véase aquí dosificaciones de MBL preferidas posteriormente), que pueda adminis-

## ES 2 271 515 T3

trarse por inyección de bolus. Las composiciones farmacéuticas para inyección de bolus comprenden preferiblemente al menos 500 µg/ml, más preferiblemente al menos 750 µg/ml, aún más preferiblemente al menos 1.000 µg/ml, por ejemplo al menos 1.300 µg/ml de MBL y/o variantes de MBL.

5 El líquido puede ser cualquier líquido útil, sin embargo, se prefiere frecuentemente que el líquido sea un líquido acuoso. Para muchos fines, en particular cuando el líquido debe usarse para administración parenteral, se prefiere además que el líquido sea estéril. La esterilidad puede conferirse por cualquier método convencional, por ejemplo, filtración, irradiación o calentamiento.

10 Se prefiere además que las composiciones farmacéuticas para administración parenteral se hayan sometido a una etapa de reducción de virus, es decir, filtración de virus y/o tratamiento ácido. El propósito de la filtración de virus es una reducción de cualquier contaminante vírico. Los filtros usados por tanto son en general de varias membranas de fibras huecas, en las que se separan el virus y otros contaminantes de la solución de proteína mediante exclusión por 15 tamaños. El principio detrás de la separación es la diferencia entre las permeabilidades de MBL y virus a través de las fibras huecas. La diferencia de permeabilidad de la proteína y el virus se aumenta en gran medida cuando la solución pasa a través de capas múltiples, por lo que preferiblemente los filtros usados comprenden varias capas. La filtración de virus puede realizarse por cualquier método convencional conocido por la persona experta, por ejemplo, como se describe aquí en el posterior ejemplo 1.

20 En una realización de la presente invención, el líquido puede comprender uno o más vehículos lipófilos, por ejemplo, uno o más vehículos lipófilos adecuados para liberación controlada de MBL y/o variantes de MBL.

El líquido puede contener además cualesquiera aditivos aceptables farmacéuticamente adecuados. Se describen aquí después aditivos aceptables farmacéuticamente preferidos.

25 Con fines de almacenamiento, la solución de proteína o suspensión de proteína puede guardarse a cualquier temperatura deseable, por ejemplo de -100°C a 0°C, tal como de 0°C a 4°C, por ejemplo de 4°C a 10°C, tal como de 10°C a 15°C, por ejemplo de 15°C a 25°C, tal como de 15°C a 35°C.

30 Por consiguiente, en una realización de la invención la solución o suspensión puede congelarse. Para muchos propósitos, la solución o suspensión se congela sólo con fines de almacenamiento y debe descongelarse antes de usar.

La composición farmacéutica puede envasarse en unidades de dosificación simples, que pueden ser más convenientes para el usuario. Por ello, las composiciones farmacéuticas para inyecciones de bolus pueden ser envases en 35 unidades de dosificación de por ejemplo como mucho 10 ml, preferiblemente como mucho 8 ml, más preferiblemente como mucho 6 ml, tal como mucho 5 ml, por ejemplo como mucho 4 ml, tal como mucho 3 ml, por ejemplo alrededor de 2,2 ml.

40 La composición farmacéutica puede envasarse en cualquier recipiente adecuado. En un ejemplo, una dosificación simple de la composición farmacéutica puede envasarse en jeringas de inyección.

En otra realización de la presente invención, la composición farmacéutica es una composición seca. La composición seca puede usarse tal cual, pero para muchos fines la composición es una composición seca sólo para almacenamiento. Antes de usar, la composición seca puede disolverse o suspenderse en una composición de líquido adecuada, 45 por ejemplo agua estéril.

Por ello, la composición farmacéutica puede ser una composición seca, que comprende proteína liofilizada. Preferiblemente, dicha composición seca es capaz de reconstituirse en una solución o suspensión.

50 La proteína puede liofilizarse usando cualquier método convencional conocido por una persona experta en la técnica. Para liofilizar, puede ser necesario añadir uno o más agentes crioprotectores. Se dan aquí después ejemplos de agentes crioprotectores preferidos.

55 En una realización de la invención, la composición farmacéutica comprende uno o más compuestos activos adicionales además de MBL y/o variantes de MBL. Tal composición farmacéutica puede proporcionarse también en forma de un juego de partes.

### *Administración*

60 La composición farmacéutica puede prepararse de manera que sea adecuada para uno o más métodos de administración particular. Además, el método de tratamiento descrito aquí puede implicar diferentes métodos de administración.

En general, puede emplearse con la presente invención cualquier método de administración en el que pueda administrarse MBL a un individuo de manera que MBL activo pueda alcanzar el lugar de la enfermedad.

65 Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse parenteralmente, es decir, por administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intranasal, intrarectal, intravaginal o intraperitoneal. Los compuestos pueden administrarse también por inhalación, es decir, por administración intranasal e inhalación oral.

## ES 2 271 515 T3

Pueden prepararse por técnicas convencionales formas de dosificación apropiadas para tal administración, tal como una formulación de aerosol o un inhalador de dosis medida.

Por consiguiente, en una realización de la presente invención, la forma de administración puede seleccionarse del grupo constituido por inyección, infusión, administración nasal, administración transdérmica, administración pulmonar, administración fijada al objetivo e iontoporética.

En general, para inyección e infusión la composición farmacéutica debe ser un líquido estéril.

La inyección puede ser una inyección en cualquier lugar preferido, por ejemplo la inyección puede seleccionarse del grupo constituido por inyección intravenosa, subcutánea, intraarterial, intramuscular e intraperitoneal. La infusión es generalmente infusión intravenosa.

En una realización preferida de la presente invención, la forma de administración es una inyección de bolus. Para tal realización, se prefiere que la composición farmacéutica comprenda una alta concentración de MBL, de modo que pueda administrarse suficiente MBL. Es una ventaja de la presente invención que las composiciones farmacéuticas proporcionadas comprendan altas concentraciones de MBL y, en consecuencia, permita administrar suficiente MBL como inyección de bolus.

Además, la vía de administración puede ser administración tópica a una membrana mucosica. La membrana mucosica a la que se administra la preparación farmacéutica de la invención puede ser cualquier membrana mucosica del mamífero al que se da la sustancia activa biológicamente, por ejemplo, en la nariz, vagina, ojo, boca, tracto genital, pulmones, tracto gastrointestinal o recto.

Las composiciones farmacéuticas según la presente invención pueden administrarse una vez o más de una, por ejemplo pueden administrarse en el intervalo de 2 a 5 veces, tal como de 5 a 10 veces, por ejemplo de 10 a 20 veces, tal como de 20 a 50 veces, por ejemplo 50 a 100 veces, tal como más de 100 veces.

La dosificación de MBL a administrar depende del individuo a tratar así como del estado clínico. En general, puede administrarse en el intervalo de 0,1 mg a 10 mg, tal como en el intervalo de 0,5 mg a 5 mg, por ejemplo alrededor de 1 mg de MBL por 10 kg de masa corporal. En una realización de la invención, la dosificación está en el intervalo de 2 a 12 mg, tal como en el intervalo de 3 a 10 mg, por ejemplo en el intervalo de 4 a 9 mg, tal como en el intervalo de 5 a 8 mg, por ejemplo en el intervalo de 6 a 7 mg, tal como alrededor de 6,6 mg de MBL por administración para un ser humano adulto.

Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden administrarse con al menos otro compuesto activo. Los compuestos pueden administrarse simultáneamente, como formulaciones separadas o combinadas en una forma de dosificación unitaria, o administrarse secuencialmente.

En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica puede administrarse como parte de un procedimiento de diagnóstico. Por ejemplo, la diagnosis puede ser determinación del nivel de uno o más compuestos en un individuo. Para fines de diagnóstico, puede requerirse administrar composiciones farmacéuticas que comprendan altos niveles de MBL a dicho individuo, por ejemplo antes de dicha determinación.

### 45 *Estabilidad de composiciones farmacéuticas*

Preferiblemente, las formulaciones farmacéuticas según la presente invención son estables, es decir, pueden almacenarse a largo plazo sin pérdida masiva de actividad y/o sin cambios principales en la distribución de tamaños. En particular, se prefiere que la MBL y/o variantes de MBL comprendidas dentro de las composiciones farmacéuticas sean estables, y más preferiblemente que la MBL y/o variantes de MBL sean estables durante el almacenamiento a largo plazo.

Por el término "estable" se entiende que la MBL y/o variantes de MBL comprendidas dentro de las composiciones farmacéuticas mantengan preferiblemente al menos parte de la actividad inicial durante el almacenamiento a largo plazo. Por ello, la MBL y/o variantes de MBL comprenden preferiblemente al menos 20%, más preferiblemente al menos 30%, aún más preferiblemente al menos 40%, aún más preferiblemente al menos 50%, aún más preferiblemente al menos 60%, aún más preferiblemente al menos 70%, aún más preferiblemente al menos 80%, aún más preferiblemente al menos 85%, aún más preferiblemente al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 96%, tal como al menos 97%, por ejemplo al menos 98%, tal como al menos 99%, por ejemplo esencialmente toda la actividad inicial después del almacenamiento a largo plazo.

Alternativamente, se prefiere que una muestra de la MBL y/o variante de MBL almacenada a largo plazo comprenda al menos 20%, tal como al menos 30%, por ejemplo al menos 40%, tal como al menos 50%, por ejemplo al menos 60%, tal como al menos 70%, por ejemplo al menos 80%, tal como al menos 85%, por ejemplo al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 96%, tal como al menos 97%, por ejemplo al menos 98%, tal como al menos 99%, por ejemplo esencialmente toda la actividad de una muestra de MBL almacenada a -80°C.

## ES 2 271 515 T3

La actividad de MBL puede determinarse por ejemplo por su capacidad para activar o inactivar el sistema de complemento. Cuando se divide C4 por MBL/MASP, se expone un éster de tiol activo y C4 resulta incorporado covalentemente a grupos nucleófilos próximos. Cuando se realiza un ensayo en un pocillo de plástico revestido, una parte sustancial del C4b resultará incorporado al pocillo de plástico revestido y puede detectarse por anticuerpo anti-C4. Puede realizarse un TRIFMA cuantitativo para actividad de MBL 1) revistiendo pocillos de microtitulación con 5 1 g de mannan en 100 l de tampón; 2) bloqueando con Tween-20; 3) aplicando complejos de MBL a una cantidad predeterminada, aplicando muestras de ensayo; 5) aplicando factor C4 de complemento purificado a 5 g/ml; 6) incubar durante una hora a 37°C; 7) aplicando anticuerpo anti-C4 marcado con Eu; 8) aplicando solución de aumento; y 9) leyendo el Eu mediante fluorometría resuelta por tiempo. (Puede realizarse de manera similar estimación por ELISA, 10 por ejemplo, aplicando anti-C4 marcado con biotina en la etapa 7; 8) aplicar avidina marcada con fosfatasa alcalina; 9) aplicar sustrato; y 10) leer la intensidad de color). Entre cada etapa se incubó la placa a temperatura ambiente y se lavó, excepto entre las etapas 8 y 9. Puede construirse una curva de calibración usando diluciones de MBL con actividad conocida. El ensayo se realiza preferiblemente en condiciones que imposibilitan la activación de C4 por las trayectorias 15 de activación de complemento clásicas o alternativas. La activación de C4 era completamente inhibida por el inhibidor de serina proteasa benzamidina. La activación de la trayectoria clásica se elimina eficazmente realizando la etapa 3) en presencia de una fuerza iónica suficientemente alta (NaCl 0,7 a 2,0 M; preferiblemente NaCl aproximadamente 1,0 M) que no interfiera con el complejo de MBL pero destruya completamente el complejo C1qrs; la activación de la trayectoria alternativa se imposibilita eficazmente ensayando con dilución como se ha descrito antes. Se prefiere no obstante determinar la actividad de MBL según el ensayo de activación de C4 descrito aquí en el siguiente ejemplo 9.

20 Preferiblemente, la MBL y/o variantes de MBL estables no se descomponen o se descomponen sólo en una cantidad limitada durante el almacenamiento a largo plazo, es decir, preferiblemente la MBL y/o variantes de MBL estables no se descomponen o se descomponen sólo en una cantidad limitada por descomposición física y/o química durante el almacenamiento. Por consiguiente, preferiblemente la mayoría de los polipéptidos comprendidos dentro de la MBL 25 y/o variantes de MBL son de la misma longitud (es decir, contienen la misma cantidad de aminoácidos) después del almacenamiento como antes del almacenamiento. Las longitudes de la MBL y/o variantes de MBL y el contenido de aminoácidos así como la concentración de proteína MBL pueden determinarse por un cierto número de métodos diferentes, por ejemplo por análisis de aminoácidos, cromatografía de intercambio aniónico, por coloración de coomasie en MBL reducida o por manchas de western de MBL no reducida, por espectrometría de masas o por cromatografía 30 de exclusión por tamaños.

Por ello, preferiblemente al menos 10%, tal como al menos 20%, tal como al menos 30%, por ejemplo al menos 40%, tal como al menos 50%, por ejemplo al menos 60%, tal como al menos 70%, por ejemplo al menos 80%, tal como al menos 85%, por ejemplo al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 96%, tal como al menos 97%, por ejemplo al menos 98%, tal como al menos 99% de los polipéptidos de MBL/variantes de MBL son al menos 50%, por ejemplo al menos 60%, tal como al menos 70%, por ejemplo al menos 80%, tal como al menos 85%, por ejemplo al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 96%, tal como al menos 97%, por ejemplo al menos 98%, tal como al menos 99%, por ejemplo alrededor del 100% de la longitud inicial.

40 Además, se prefiere que al menos 50%, por ejemplo al menos 60%, tal como al menos 70%, por ejemplo al menos 80%, tal como al menos 85%, por ejemplo al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 96%, tal como al menos 97%, por ejemplo al menos 98%, tal como al menos 99% de los polipéptidos de MBL/variantes de MBL no muestran cambios de la cadena de polipéptido después del almacenamiento cuando se investigan por espectrometría de masas.

45 Además, se prefiere que al menos 50%, por ejemplo al menos 60%, tal como al menos 70%, por ejemplo al menos 80%, tal como al menos 85%, por ejemplo al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 96%, tal como al menos 97%, por ejemplo al menos 98%, tal como al menos 99% de los polipéptidos de MBL/variantes de MBL almacenados eluyen de manera similar a la MBL/variantes de MBL iniciales o MBL/variantes de MBL almacenadas 50 a -80°C tras cromatografía de exclusión por tamaños. La cromatografía de exclusión por tamaños puede realizarse por ejemplo como se describe aquí en el posterior ejemplo 10.

Por la expresión "longitud inicial" se entiende la longitud de polipéptidos de MBL/variantes de MBL antes de almacenar o alternativamente la longitud de polipéptidos de MBL/variantes de MBL almacenados a -80°C, que en 55 una realización preferida de la invención corresponde a MBL de longitud completa, por ejemplo la longitud completa del polipéptido como se identifica por SEQ ID NO. 1. En general, la longitud de MBL/variante de MBL puede determinarse determinando el peso molecular de polipéptidos de MBL/variantes de MBL medido en Daltons.

Por la expresión almacenamiento a largo plazo se entiende almacenamiento en el intervalo de 1 a 4 semanas, tal 60 como de 1 a 3 meses, tal como de 3 a 6 meses, tal como de 6 a 12 meses, por ejemplo de 1 a 2 años, tal como de 2 a 3 años, por ejemplo de 3 a 5 años, tal como de 5 a 7 años, por ejemplo de 7 a 10 años, tal como más de 10 años. Preferiblemente, el almacenamiento a largo plazo está en el intervalo de 1 a 2 años, más preferiblemente en el intervalo de 2 a 5 años.

65 La estabilidad de MBL y/o variantes de MBL depende de las condiciones de almacenamiento. Preferiblemente, la MBL y/o variantes de MBL son estables cuando se almacenan a una temperatura por ejemplo en el intervalo de -80°C a -20°C, tal como de -25°C a -15°C, por ejemplo de -15°C a 0°C, tal como de 0°C a 4°C, por ejemplo de 2°C a 10°C, tal como de 5°C a 15°C, por ejemplo de -10°C a 20°C, tal como de 15°C a 35°C, por ejemplo de 15°C a 30°C, tal como

# ES 2 271 515 T3

de 15°C a 25°C. En una realización preferida de la invención, la MBL y/o variantes de MBL pueden almacenarse a temperaturas alrededor de 4°C. En otra realización preferida de la invención, la MBL y/o variantes de MBL pueden almacenarse a temperaturas alrededor de -20°C. En otra realización preferida todavía de la invención, la MBL y/o variantes de MBL pueden almacenarse a temperaturas alrededor de 37°C.

5 La estabilidad de MBL y/o variantes de MBL puede depender además de la naturaleza de la composición farmacéutica. Por ejemplo, la estabilidad de MBL y/o variantes de MBL puede ser diferente cuando la composición farmacéutica es una solución, una suspensión o materia seca.

## 10 *Homólogos funcionales*

Se entiende que los homólogos funcionales de polipéptidos según la presente invención comprenden cualquier secuencia de polipéptido que sea capaz de realizar esencialmente la misma función o parcialmente la misma función que un polipéptido de una secuencia predeterminada específica.

15 Por consiguiente, los homólogos funcionales según la presente invención comprenden polipéptidos con una secuencia de aminoácidos, que comparta al menos alguna homología con secuencias de polipéptidos predeterminadas como se ha indicado antes aquí.

20 Preferiblemente, los homólogos funcionales de MBL humana comprenden polipéptidos que comparten al menos alguna homología con los polipéptidos identificados por SEQ ID NO 1. Preferiblemente, los homólogos funcionales de MASP-1 humana comprenden polipéptidos que comparten al menos alguna homología con los polipéptidos identificados por SEQ ID NO 2. Preferiblemente, los homólogos funcionales de MASP-2 humana comprenden polipéptidos que comparten al menos alguna homología con los polipéptidos identificados por SEQ ID NO 3. Preferiblemente, los 25 homólogos funcionales de MASP-3 humana comprenden polipéptidos que comparten al menos alguna homología con los polipéptidos identificados por SEQ ID NO 4.

30 Por ejemplo, tales polipéptidos son al menos aproximadamente 40 por ciento, tal como al menos aproximadamente 50 por ciento homólogos, por ejemplo al menos aproximadamente 60 por ciento homólogos, tal como al menos 35 aproximadamente 70 por ciento homólogos, por ejemplo al menos aproximadamente 75 por ciento homólogos, tal como al menos aproximadamente 80 por ciento homólogos, por ejemplo al menos aproximadamente 85 por ciento homólogos, tal como al menos aproximadamente 90 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 92 por ciento homólogos, tal como al menos 94 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 95 por ciento homólogos, tal como al menos 96 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 97 por ciento homólogos, tal como al menos 98 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 99 por ciento homólogos con las secuencias de polipéptidos predeterminadas como se ha indicado antes aquí.

40 La homología puede calcularse preferiblemente por cualquier algoritmo adecuado o mediante realizaciones por ordenador de tales algoritmos, por ejemplo CLUSTAL en el programa PC/Gene de Intelligenetics o GAP, BEST-FIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG). La homología entre secuencias de aminoácidos puede calcularse adicionalmente con ayuda de matrices muy conocidas tales como, por ejemplo, cualquiera de las BLOSUM 30, BLOSUM 40, BLOSUM 45, BLOSUM 50, BLOSUM 55, BLOSUM 60, BLOSUM 62, BLOSUM 65, BLOSUM 70, BLOSUM 75, BLOSUM 80, BLOSUM 85 y BLOSUM 90.

45 Los homólogos funcionales pueden comprender una secuencia de aminoácidos que comprenda al menos una sustitución de un aminoácido por cualquier otro aminoácido. Por ejemplo, tal sustitución puede ser una sustitución de aminoácido conservadora o puede ser una sustitución de aminoácido no conservadora.

50 Una sustitución de aminoácido conservadora es una sustitución de un aminoácido dentro de un grupo predeterminado de aminoácidos por otro aminoácido dentro del mismo grupo, en la que los aminoácidos dentro de un grupo predeterminado presentan características similares o sustancialmente similares. Dentro del significado de la expresión “sustitución de aminoácido conservadora” según se aplica aquí, un aminoácido puede sustituirse por otro dentro de grupos de aminoácidos caracterizados por tener

- 55 i) cadenas secundarias polares (Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr y Cys)  
ii) cadenas secundarias no polares (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro y Met)  
60 iii) cadenas secundarias alifáticas (Gly, Ala, Val, Leu, Ile)  
iv) cadenas secundarias cíclicas (Phe, Tyr, Trp, His, Pro)  
v) cadenas secundarias aromáticas (Phe, Tyr, Trp)  
65 vi) cadenas secundarias ácidas (Asp, Glu)  
vii) cadenas secundarias básicas (Lys, Arg, His)

# ES 2 271 515 T3

- viii) cadenas secundarias amida (Asn, Gln)
- ix) cadenas secundarias hidroxi (Ser, Thr)
- 5 x) cadenas secundarias que contienen azufre (Cys, Met) y
- xi) aminoácidos que son ácidos monoamino-dicarboxílicos o ácidos monoaminomonocarboxílicos-monoamido-carboxílicos (Asp, Glu, Asn, Gln).

10 Los homólogos funcionales según la presente invención pueden comprender más de una de tales sustituciones, tales como, por ejemplo, dos sustituciones de aminoácidos, por ejemplo tres o cuatro sustituciones de aminoácidos, tales como cinco o seis sustituciones de aminoácidos, por ejemplo siete u ocho sustituciones de aminoácidos, tales como de 10 a 15 sustituciones de aminoácidos, por ejemplo de 15 a 25 sustituciones de aminoácidos, tal como de 25 a 30 sustituciones de aminoácidos, por ejemplo de 30 a 40 sustituciones de aminoácidos, tal como de 40 a 50 sustituciones de aminoácidos, por ejemplo de 50 a 75 sustituciones de aminoácidos, tal como de 75 a 100 sustituciones de aminoácidos.

15

La adición o supresión de un aminoácido puede ser una adición o supresión de 2 a 5 aminoácidos, tal como de 5 a 10 aminoácidos, por ejemplo de 10 a 20 aminoácidos, tal como de 20 a 50 aminoácidos. Sin embargo, también están comprendidas dentro de la presente invención adiciones o supresiones de más de 50 aminoácidos, tal como adiciones de 50 a 200 aminoácidos.

20 Los polipéptidos según la presente invención, incluyendo cualesquiera variantes y homólogos funcionales de ellos, pueden comprender en una realización más de 5 residuos de aminoácidos, tal como más de 10 residuos de aminoácidos, por ejemplo más de 20 residuos de aminoácidos, tal como más de 25 residuos de aminoácidos, por ejemplo más de 50 residuos de aminoácidos, tal como más de 75 residuos de aminoácidos, por ejemplo más de 100 residuos de aminoácidos, tal como más de 150 residuos de aminoácidos, por ejemplo más de 200 residuos de aminoácidos.

25 Pueden tenerse en consideración factores adicionales cuando se determinan homólogos funcionales según el significado usado aquí. Por ejemplo, los homólogos funcionales pueden ser capaces de asociarse con antisueros que sean específicos para los polipéptidos según la presente invención.

30 También están abarcados dentro de la presente invención péptidos con alquilaciones N-terminales y esterificaciones C-terminales. Los homólogos funcionales comprenden también polipéptidos modificados post-traducción, por ejemplo polipéptidos glicosilados.

## *Aditivos aceptables farmacéuticamente*

35 Las composiciones farmacéuticas que contienen MBL o variantes de MBL pueden prepararse por cualquier técnica convencional, por ejemplo, como se describe en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1995, redactado por E.W. Martin, Mack Publishing Company, 19<sup>a</sup> edición, Easton, Pa.

40 Los aditivos farmacéuticos aceptables pueden ser cualquier aditivo farmacéutico aceptable usado convencionalmente, que debe seleccionarse según la formulación específica, la vía de administración pretendida, etc. Por ejemplo, los aditivos farmacéuticos aceptables pueden ser cualquiera de los aditivos mencionados en Nema *et al.*, 1997. Además, el aditivo farmacéutico aceptable puede ser cualquier aditivo aceptado de la "lista de ingredientes inactivos" de la FDA, que está disponible por ejemplo en la dirección de internet <http://www.fda.gov/cder/drug/iig/default.htm>.

45 En algunas realizaciones de la presente invención, es deseable que la composición farmacéutica comprenda un agente isotónico. En particular, cuando la composición farmacéutica se prepara para administración por inyección o infusión es deseable a menudo añadir un agente isotónico.

50 Por consiguiente, la composición puede comprender al menos un aditivo aceptable farmacéuticamente que sea un agente isotónico.

55 La composición farmacéutica puede ser isotónica, hipotónica o hipertónica. Sin embargo, se prefiere a menudo que una composición farmacéutica para infusión o inyección sea esencialmente isotónica cuando se administra. Por ello, para almacenamiento, la composición farmacéutica puede ser preferiblemente isotónica o hipertónica. Si la composición farmacéutica es hipertónica para almacenamiento, puede diluirse para hacerse una solución isotónica antes de administrar.

60 El agente isotónico puede ser un agente isotónico iónico tal como una sal o un agente isotónico no iónico tal como un hidrato de carbono.

65 Los ejemplos de agentes isotónicos iónicos incluyen, aunque sin limitarse a ellos, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, KCl y MgCl<sub>2</sub>. Los ejemplos de agentes isotónicos no iónicos incluyen, aunque sin limitarse a ellos, manitol y glicerol.

## ES 2 271 515 T3

También está contenido dentro de la presente invención que al menos un aditivo aceptable farmacéuticamente sea un tampón. Para algunos propósitos, por ejemplo cuando la composición farmacéutica se pretende para infusión o inyección, es deseable a menudo que la composición comprenda un tampón, que sea capaz de tamponar una solución a un pH en el intervalo de 4 a 10, tal como de 5 a 9, por ejemplo de 6 a 8.

5 Sin embargo, en otras realizaciones de la invención, la composición farmacéutica puede no comprender tampón en absoluto o sólo cantidades micromolares de tampón.

10 El tampón puede seleccionarse por ejemplo del grupo constituido por tampón TRIS, acetato, glutamato, lactato, maleato, tartrato, fosfato, citrato, carbonato, glicinato, histidina, glicina, succinato y trietanolamina. Por ello, el tampón puede ser  $K_2HPO_4$ ,  $Na_2HPO_4$  o citrato sódico.

15 El tampón TRIS es conocido bajo otros nombres diversos, por ejemplo, trometamina incluyendo trometamina USP, THAM, Trizma, Trisamina, Tris amino y trometamol. La designación TRIS cubre todas las designaciones antedichas.

20 El tampón puede además seleccionarse por ejemplo de tampones compatibles USP para uso parenteral, en particular, cuando la formulación farmacéutica es para uso parenteral. Por ejemplo, el tampón puede seleccionarse del grupo constituido por ácidos monobásicos tales como acético, benzoico, glucónico, glicérico y láctico, ácidos dibásicos tales como aconítico, adípico, ascórbico, carbónico, glutámico, málico, succínico y tartárico, ácidos polibásicos tales como cítrico y fosfórico y bases tales como amoníaco, dietanolamina, glicina, trietanolamina y TRIS.

25 En realizaciones preferidas de la presente invención, las composiciones farmacéuticas según la presente invención no contienen estabilizantes, en particular se prefiere que las composiciones farmacéuticas no contengan estabilizantes que contengan proteína, aún más preferiblemente las composiciones farmacéuticas no contienen estabilizantes que contengan proteína y detergentes. Las formulaciones farmacéuticas en las que el ingrediente activo es una proteína o un péptido comprenden en general uno o más estabilizantes. Dichos estabilizantes son frecuentemente una o más proteínas o uno o más detergentes. Es deseable frecuentemente reducir la cantidad de aditivos en una composición farmacéutica. Por ello, las composiciones farmacéuticas preferidas según la presente invención no contienen ninguna proteína y/o detergente.

30 Sin embargo, en otras realizaciones de la invención, las composiciones farmacéuticas pueden comprender al menos un aditivo aceptable farmacéuticamente que sea un estabilizante. El estabilizante puede ser por ejemplo un detergente, un aminoácido, un ácido graso, un polímero, un alcohol polivalente, un ion de metal, un agente reductor, un agente de quelación o un antioxidante, aunque puede usarse también cualquier otro estabilizante adecuado con la presente invención.

Por ejemplo, el estabilizante puede seleccionarse del grupo constituido por poloxámeros, Tween-20, Tween-40, Tween-60, Tween-80, Brij, iones de metales, aminoácidos, polietilenglicol, Triton, EDTA y ácido ascórbico.

40 Además, el estabilizante puede seleccionarse del grupo constituido por aminoácidos tales como glicina, alanina, arginina, leucina, ácido glutámico y ácido aspártico, tensioactivos tales como polisorbato 20, polisorbato 80 y poloxámero 407, ácidos grasos tales como fosfatidil colinem etanolamina y triptofanato de acetilo, polímeros tales como polietilenglicol y polivinilpirrolidona, alcoholes polivalentes tales como sorbitol, manitol, glicerina, sacarosa, glucosa, propilenglicol, etilenglicol, lactosa y trehalosa, antioxidantes tales como ácido ascórbico, HCl de cisteína, tioglicerol, 45 ácido tioglicólico, tiosorbitol y glutationa, agentes reductores tales como varios tioles, agentes de quelación tales como sales de EDTA, ácido glutámico y ácido aspártico e iones de metales tales como  $Ca^{++}$ ,  $Ni^{++}$ ,  $Mg^{++}$  y  $Mn^{++}$ .

50 Otros ejemplos de antioxidantes y agentes reductores útiles con la presente invención incluyen acetona bisulfito sódico, ascorbato, bisulfito sódico, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, HCl de cisteína/cisteinato, ditiotiobato sodico, ácido gentísico, ácido gentísico etanolamina, glutamato monosódico, formaldehído sulfoxilato sódico, metabisulfito potásico, metabisulfito sódico, monotioglicerol, galato de propilo, sulfito sódico y tioglicolato sódico.

55 La composición farmacéutica según la invención puede comprender también uno o más agentes crioprotectores. En particular, cuando la composición comprende proteína liofilizada o la composición debe almacenarse congelada, puede ser deseable añadir un agente crioprotector a la composición farmacéutica.

60 El agente crioprotector puede ser cualquier agente crioprotector útil, por ejemplo el agente crioprotector puede seleccionarse del grupo constituido por dextrano, glicerina, polietilenglicol, sacarosa, trahalosa y manitol.

65 Por consiguiente, los aditivos aceptables farmacéuticamente pueden comprender uno o más seleccionados del grupo constituido por sal isotónica, sal hipertónica, tampón y estabilizantes. Además, los aditivos aceptables farmacéuticamente pueden comprender un o más seleccionados del grupo constituido por agentes isotónicos, tampón, estabilizantes y agentes crioprotectores. Por ejemplo, los aditivos aceptables farmacéuticamente comprenden glucosa monohidrato, glicina, NaCl y polietilenglicol 3350.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición de MBL que comprende uno o más cationes.

# ES 2 271 515 T3

Sorprendentemente, la adición de cationes a una solución de MBL puede producir una estabilidad aumentada de MBL y/o variantes de MBL. Preferiblemente, las composiciones comprenden en el intervalo de 0,01 mM a 1.000 mM, más preferiblemente en el intervalo de 0,05 mM a 500 mM, aún más preferiblemente en el intervalo de 0,1 mM a 100 mM, todavía más preferiblemente en el intervalo de 0,2 mM a 50 mM, incluso más preferiblemente en el intervalo de 0,3 mM a 25 mM, todavía más preferiblemente en el intervalo de 0,5 mM a 10 mM, tal como en el intervalo de 0,5 mM a 10 mM, tal como en el intervalo de 0,5 mM a 5 mM, por ejemplo en el intervalo de 0,5 mM a 2 mM, tal como alrededor de 1 mM de catión divalente. El catión es preferiblemente un catión divalente, y, por consiguiente, la invención se refiere a una composición de MBL que comprende uno o más cationes divalentes.

El catión divalente es preferiblemente un metal divalente catiónico. Por ejemplo, el catión divalente puede seleccionarse del grupo constituido por  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Ni}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{Mn}^{++}$ . Preferiblemente sin embargo, el catión divalente es  $\text{Ca}^{++}$ . El  $\text{Ca}^{++}$  puede añadirse a la solución como cualquier sal adecuada, por ejemplo como  $\text{CaCl}_2$ .

En una realización preferida, la composición de MBL es como se ha descrito antes con respecto a contenido de MBL.

## Estado clínico

Puede tratarse un cierto número de estados clínicos usando las composiciones farmacéuticas según la presente invención. En particular sin embargo pueden tratarse los siguientes estados:

1. Infecciones
2. Deficiencia de MBL
- 25 3. Estados inmunocomprometidos.

Las infecciones pueden ser por ejemplo una infección por bacterias, hongos, virus o parásitos. Por ejemplo, infección por una o más bacterias seleccionadas del grupo constituido por *Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter calcoaceticus*, preferiblemente *A. anitratus*, *A. haemolyticus*, *A. alcaligenes* y *A. iwoffii*, *Actinomyces israelii*, *Aeromonas hydrophilia*, especie Alcaligenes, preferiblemente *A. faecalis*, *A. odorans* y *A. denitrificans*, *Arizona hinshawii*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia recurrentis*, especie Brucella, preferiblemente *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* y *B. canis*, *Calymmatobacterium granulomatis*, *Campylobacter fetus esp. intestinalis*, *Campylobacter fetus esp. jejuni*, especie Chlamydia, preferiblemente *C. psittaci* y *C. trachomatis*, *Chromobacterium violaceum*, especie Citrobacter, preferiblemente *C. freundii* y *C. diversus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium*, preferiblemente *C. ulcerans*, *C. haemolyticum* y *C. pseudotuberculosis*, *Coxiella burnetii*, *Edwardsiella tarda*, *Eikenella corrodens*, *Enterobacter*, preferiblemente *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. hafniae* (también llamada *Hafnia alvei*) y *E. agglomerans*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Francisella tularensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, especie Helicobacter, especie Klebsiella, preferiblemente *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* o *K. rhinoscleromatis*, especie Legionella, *Leptospira interrogans*, *Listra monocytogenes*, especie Moraxella, preferiblemente *M. lacunata* y *M. osloensis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, especie Mycoplasma, preferiblemente *M. lacunata* y *M. osloensis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, especie Mycoplasma, preferiblemente *M. pneumoniae*, *Neisseria Gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, especie Nocardia, preferiblemente *N. asteroides* y *N. brasiliensis*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Peptococcus magnus*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pneumococci*, especie Proteus, preferiblemente *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri* y *P. morganii* (también llamada *Providencia rettgeri* y *Morganella morganii* respectivamente), especie Providencia, preferiblemente *P. alcalifaciens*, *P. stuartii* y *P. rettgeri* (también llamada *Proteus rettgeri*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mallei*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Rickettsia*, *Rochalimaea hel-selae*, especie Salmonella, preferiblemente *S. enteridis*, *S. typhi* y *S. derby*, y más preferiblemente especie *Salmonella* del tipo *Salmonella DT104*, especie *Serratia*, preferiblemente *S. marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*, *Spirillum minor*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptobacillus moniliformis*, *Streptococcus*, preferiblemente *S. faecalis*, *S. faecium* y *S. durans*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema carateum*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, preferiblemente *T. pallidum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pestis*.

Los estados inmunocomprometidos incluyen cualquier deficiencia funcional de uno o más componentes del sistema inmune, por ejemplo uno o más componentes del sistema inmune celular, tal como por ejemplo células inmunes o uno o más componentes del sistema inmune humorar. La deficiencia puede ser causada por falta del componente o por la presencia de cantidades reducidas del componente, o puede ser debida a alteraciones funcionales del componente o partes del componente.

En un ejemplo, el estado inmunocomprometido puede ser deficiencia de MASP.

# ES 2 271 515 T3

## *Individuo con necesidad de tratamiento de MBL*

El individuo que necesite tratamiento de MBL o un medicamento que comprenda MBL según la invención puede ser cualquier individuo, por ejemplo puede ser un individuo que padezca un estado clínico o un individuo en riesgo de adquirir un estado clínico. Preferiblemente, el individuo es un ser humano.

En una realización preferida de la presente invención, el individuo padece uno de los estados clínicos descritos antes aquí. En otra realización preferida, el individuo está con riesgo aumentado de adquirir un estado clínico como se ha descrito antes aquí.

Por ejemplo, el individuo puede tener riesgo aumentado de adquirir una infección. El riesgo aumentado puede tener varias razones diferentes, sin embargo frecuentemente el riesgo aumentado estará asociado con una deficiencia funcional en uno o más componentes del sistema inmune. La deficiencia funcional del sistema inmune puede ser una deficiencia en el sistema inmune celular y/o el sistema inmune humorar.

Los componentes del sistema inmune celular implican por ejemplo neutrófilos, células T, células B, basófilos y fagocitos. La deficiencia funcional puede proceder de una o más de dichas células o por malfunción de una o más de dichas células.

Los componentes de los sistemas inmunes humorales incluyen por ejemplo la trayectoria de complemento y la trayectoria de complemento de lectina. Por consiguiente, en una realización de la invención, el individuo es un individuo con una deficiencia funcional de MBL. Por ejemplo, el individuo puede tener un nivel en suero subnormal de MBL.

Un nivel en suero subnormal de MBL se refiere a una concentración de MBL en suero que es más baja que la concentración en suero normal de MBL. Por ejemplo, el nivel en suero de MBL puede ser <2.000 ng/ml, tal como <1.500 ng/ml, por ejemplo <1.000 ng/ml, tal como <900 ng/ml, por ejemplo <800 ng/ml, tal como <700 ng/ml, por ejemplo <600 ng/ml, tal como <500 ng/ml, por ejemplo <400 ng/ml, tal como <300 ng/ml, por ejemplo <200 ng/ml, tal como <100 ng/ml.

## **Ejemplos**

Los siguientes ejemplos ilustran realizaciones seleccionadas de la presente invención y no deben considerarse limitativos de la invención.

### **Ejemplo 1**

#### *Formulación de MBL*

	Contenido	Concentración
40	MBL	1 mg/ml
	tampón Tris	10 mM, pH 7,4
	NaCl	140 mM

MBL es MBL humano recombinante preparado y purificado como se describe en la solicitud PCT WO00/70043. Brevemente, el gen de MBL humana genómica se multiplicó por PCR y se insertó en un vector pREP9 (nº de cat. V009-50, Invitrogen). Se transfecaron células HEK 293EBNA con la construcción y medio de cultivo de las células transfectadas *MBL/pREP9*, se hicieron pasar sobre una columna de perlas Fractogel TSK HW-75 (nº de cat. 14985, Merck KgaA, Darmstadt, Alemania), que se habían acoplado a manosa y se habían prelavado en 15 ml de glicina 0,1 M (pH 3,0) y se habían equilibrado en TBS/Tween-20 al 0,05% (v/v), CaCl<sub>2</sub> 2 mM. La columna se lavó en 75 ml de TBS, CaCl<sub>2</sub> 2 mM.

Se eluye MBL recombinante en un tampón que contiene tampón Tris 10 mM y NaCl 140 mM en la última etapa de purificación. A continuación, la formulación se filtra de virus sobre un filtro Planova consistente en 150 capas, lo que conduce a alta retención de virus (7 logs).

Existen varios filtros Planova y se seleccionan los filtros de tamaño 75N y 35N para filtración de virus de solución de MBL. Se seleccionaron los 75N y 35N después de un estudio de la recuperación de MBL usando filtros Planova con diferentes tamaños de poros. Los filtros 15N y 20N están disponibles comercialmente pero el tamaño de poros es demasiado pequeño para filtrar MBL. El filtro 75N sólo filtra virus mayores como VIH y trabaja más como un prefiltro que un filtro de separación de virus. El Planova 35N separa virus mayores de un tamaño de 35 nm, que incluyen reovirus pero no virus más pequeños como polio- y parvovirus. Para virus más pequeños, se supone que una etapa de tratamiento ácido durante la purificación de MBL es eficaz para inactivación de virus.

Primero, se hace pasar la solución de MBL a través del filtro 75N y en segundo lugar se hace pasar seguidamente el filtrado a través del filtro 35N. Ambas filtraciones se realizan como filtración terminal. Para escala de laboratorio, se usa un filtro de 0,01 m<sup>2</sup>. En escala de producción piloto, se usa un filtro de 0,3 m<sup>2</sup>.

## ES 2 271 515 T3

Finalmente, la solución de MBL se diluye en tampón Tris 10 mM y NaCl 140 mM hasta una concentración final de 1 mg/ml, se somete a filtración estéril sobre un filtro de 0,22 µm y se divide en partes alícuotas de 2,2 ml.

Esta formulación es adecuada para administración parenteral. En particular, puede administrarse 1 parte alícuota a 5 un niño (dependiendo de la edad) y pueden administrarse 3 partes alícuotas a un adulto humano.

### Ejemplo 2

#### 10 *Formulación de MBL*

	Contenido	En 1 ml de la formulación
	MBL	1 mg
15	Tampón Tris	1,2 mg
	NaCl	5,8 mg
	Manitol	7,3 mg

20 MBL es MBL humano recombinante preparado y purificado como se describe en la solicitud PCT WO00/70043. Se eluye MBL recombinante en un tampón que contiene 1,2 mg/ml de tampón Tris y 5,8 mg/ml de NaCl en la última etapa de purificación. Seguidamente, se añaden a la solución de MBL 7,3 mg/ml de manitol. La formulación se somete a filtración estéril antes de usar.

25 Esta formulación es adecuada para administración parenteral.

### Ejemplo 3

#### 30 *Formulación de MBL*

	Contenido	En 1 ml de la formulación
	MBL	1 mg
35	Tampón Tris	1,2 mg
	NaCl	5,8 mg
	Manitol	7,3 mg
	Tween-80	0,1 mg

40 MBL es MBL humano recombinante preparado y purificado como se describe en la solicitud PCT WO00/70043. Se eluye MBL recombinante en un tampón que contiene 1,2 mg/ml de tampón Tris y 5,8 mg/ml de NaCl en la última etapa de purificación. Seguidamente, se añaden a la solución de MBL 7,3 mg/ml de manitol y 0,1 mg de Tween-80. La formulación se somete a filtración estéril y se filtra el virus (véase el ejemplo 1) antes de usar.

45 Esta formulación es adecuada para administración parenteral.

### Ejemplo 4

#### 50 *Formulación de MBL*

10 mg/ml de MBL

55 Tris 10 mM, pH = 7,4.

NaCl 140 mM

60 Se prepara MBL recombinante como se describe en el ejemplo 1. Se concentra después MBL usando un dispositivo de filtración exponiendo la proteína a 3.500 x g. La formulación se somete a filtración estéril y se filtra el virus (véase el ejemplo 1) antes de usar.

65 La formulación es adecuada para administración parenteral.

## ES 2 271 515 T3

### Ejemplo 5

MBL: 1 mg/ml

5 Tampón Tris: 10 mM

NaCl: 140 mM

10 CaCl<sub>2</sub>: 0,1 mM

Se prepara MBL recombinante como se describe en el ejemplo 1. Se añade CaCl<sub>2</sub> hasta una concentración final de 1 mM. La formulación se somete a filtración estéril y se filtra el virus (véase el ejemplo 1) antes de usar.

15 La formulación es adecuada para administración parenteral.

### Ejemplo 6

20 MBL: 5 mg/ml

Tampón Tris: 10 mM

25 NaCl: 140 mM

CaCl<sub>2</sub>: 1 mM

30 Se prepara MBL recombinante como se describe en el ejemplo 1. Se concentra después MBL usando un dispositivo de filtración exponiendo la proteína a 3.500 x g. Se añade CaCl<sub>2</sub> hasta una concentración final de 1 mM. La formulación se somete a filtración estéril y se filtra el virus (véase el ejemplo 1) antes de usar.

La formulación es adecuada para administración parenteral.

### Ejemplo 7

MBL: 10 mg/ml

40 Tampón Tris: 10 mM

NaCl: 140 mM

45 CaCl<sub>2</sub>: 1 mM

50 Se prepara MBL recombinante como se describe en el ejemplo 1. Se concentra después MBL usando un dispositivo de filtración exponiendo la proteína a 3.500 x g. Se añade CaCl<sub>2</sub> hasta una concentración final de 1 mM. La formulación se somete a filtración estéril y se filtra el virus (véase el ejemplo 1) antes de usar.

La formulación es adecuada para administración parenteral.

### Ejemplo 8

#### 55 *Estabilidad de formulaciones farmacéuticas que comprenden MBL*

Se ha formulado MBL recombinante como una solución líquida y se ha ensayado la estabilidad en material de almacenamiento aceptable para almacenamiento de proteína líquida. Se ensayó un número de tres formulaciones diferentes con diferentes concentraciones de MBL y se ensayó en una formulación un efecto estabilizante de iones calcio.

60 Una formulación en 1 mg/ml sin ningún excipiente estabilizante de proteína mostró una estabilidad sorprendentemente alta cuando se almacenó congelada (-20°C) y enfriada (+4°C) durante 12 meses. No se midió disminución de actividad ni hubo cambios en la cadena de polipéptido cuando se investigó por espectrometría de masas. No se observaron cambios en el contenido de proteína por análisis de aminoácidos o cromatografía de intercambio aniónico. No se observaron productos de degradación por coloración de coomasie en MBL reducida o mediante manchas de western en MBL no reducida. Se observó por cromatografía de exclusión por tamaños un pequeño pico frontal, que es causado probablemente por MBL agregada, correspondiente a sólo aproximadamente el 1% del contenido de MBL

# ES 2 271 515 T3

total. Los resultados obtenidos para una formulación de mayor contenido de MBL (10 mg/ml y 5 mg/ml) indican la posibilidad de formación de agregados causada por la etapa de concentración tensionante más que por el almacenamiento. La adición de iones calcio mostró un efecto estabilizante drástico sin cambios de actividad después de 2 meses de almacenamiento a +37°C.

5

## *Introducción*

Se han desarrollado tres formulaciones farmacéuticas que comprenden lectina de unión a manosa recombinante (rMBL) y se ha llenado con ellas material de almacenamiento aceptable para uso farmacéutico. El llenado se hizo 10 asepticamente usando sólo viales estériles, tapones de caucho y se realizó en una campana de aire laminar. El tipo de formulación, el material de almacenamiento y el procedimiento de llenado hacen por tanto a la preparación altamente representativa de un producto fármaco de MBL para uso clínico. Se ensayó la estabilidad de estas formulaciones por almacenamiento a diferentes temperaturas y tiempo de incubación. Se vigiló la temperatura de todo el equipo de almacenamiento.

15

Se estudiaron las siguientes formulaciones de MBL:

- PE0238: 1 mg/ml de MBL en Tris 10 mM, NaCl 140 mM y pH = 7,4.
- 20 - PE0305: 10 mg/ml de MBL en Tris 10 mM, NaCl 140 mM y pH = 7,4.
- PE0407: 5 mg/ml de MBL en Tris 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM y pH = 7,4.

Todas las referencias usadas en estos estudios se mantuvieron a -80°C y se aceptaron como estables cuando se 25 usaron.

## **Métodos**

### *El ensayo de activación de C4*

30

El ensayo de activación de C4 se realizó como se describe aquí en el posterior ejemplo 9. El ensayo de activación de C4 mide la capacidad de MBL para unirse a MASPs (proteasas asociadas a proteína de unión a manosa), y por unión a un objetivo hidrato de carbono, activan las MASPs. El complejo MBL/MASPs divide a continuación C4 e inicia la trayectoria de lectina de activación de complemento. La activación de C4 es por tanto una medida de la eficacia biológica de MBL.

35

Este ensayo es el principal ensayo indicador de estabilidad para MBL.

### *Cromatografía de exclusión por tamaños (SEC)*

40

La SEC es un análisis cromatográfico realizado en una columna Superose 6 (Amersham Biosciences) como se describe aquí en el posterior ejemplo 10: MBL y otros componentes se separan por volumen molecular, que, para proteínas globulares, es proporcional a la masa molecular.

45

El análisis SEC se usa para verificación de la estructura de alta masa de MBL. Mientras que los oligómeros de alta masa eluyen pronto en un cromatograma, los no oligómeros eluyen tarde en el cromatograma. Además, pueden detectarse agregados mayores que MBL oligomérica, si están presentes en la muestra. Finalmente, el análisis podría usarse también para cuantificar el contenido de MBL.

50

### *Espectrometría de masas (MALDI-MS)*

Inicialmente, la muestra se reduce y purifica según un procedimiento genérico para separar componentes no proteínicos y limitar la señal de fondo.

55

Se hace MALDI-MS para verificar el perfil de masas de la cadena de polipéptido de MBL e identificar productos de degradación potenciales de la cadena de polipéptido.

## **Resultados**

60

### *Ensayo de activación de C4*

PE0238: El ensayo de activación de C4 indica idéntica actividad para la formulación de 1 mg/ml, cuando se guarda 12 meses a -20 y +4 grados centígrados como para la referencia. Los resultados se muestran en la figura 1 como una curva de seis puntos con valores EC50 en el 105% para el almacenamiento a +4 grados y el 104% para el 65 almacenamiento a -20 grados en comparación con la referencia en el 100%.

PE0305: La actividad inicial se mide al 94% con relación con la referencia estándar para la formulación de 10 mg/ml. Después de 2½ meses, disminuye la actividad a alrededor del 80% para las muestras congelada y enfriada y al

## ES 2 271 515 T3

36% para la muestra a +37 grados. Después de 5 meses, la actividad es todavía alrededor del 80% para las muestras congelada y enfriada, en donde se mide una caída al 14,3% para la muestra a +37°C. Se obtienen resultados por curvas de estabilidad de la activación de C4 y se listan como valores EC50 en la tabla 1. Sólo se consideran significativos cambios de más de -15%.

5

TABLA 1

Activación de C4 en muestras de estabilidad. El análisis  $T = 0$  es una estimación simple. La actividad se calcula en % de EC50 con relación a una MBL patrón. Se ilustran mediciones por triplicado con variaciones estándar

Tipo de almacenamiento	-20°C	+4°C	+37°C
T = 0 meses	94% (N=1)	Igual que a -20°C	Igual que a -20°C
T = 2½ meses	81% (N=1)	78% (N=1)	36% (N=1)
T = 5 meses	81,7% $\pm$ 4,7 (N=3)	80,3% $\pm$ 7,6 (N=3)	14,3% $\pm$ 1,5 (N=3)

20

PE0407: Se ensayó la actividad de la formulación de 5 mg/ml y se observó sólo sorprendentemente una disminución de actividad muy pequeña para la muestra guardada a +37 grados y, en comparación con la muestra congelada, no se observan cambios. Se miden las actividades al 91% para la congelada, al 92 para la muestra enfriada y al 94 para la muestra a +37 grados C. Se incubó un testigo sin calcio a +37 grados al 19% de actividad. Se obtienen resultados por curvas de activación de C4 y se listan en la tabla 2 como valores EC50.

25

TABLA 2

Datos de activación de C4 en muestras de estabilidad de 5 mg/ml en comparación con la referencia N105-11A, EC50 = 100%

Tipo de almacenamiento	-20°C	+4°C	+37°C	Testigo 37°C
T = 2 meses	91%	92%	94%	19%

Datos SEC

40

PE0238: Se analizó la formulación de 1 mg/ml para detectar cambios de masa molecular. La referencia eluye en 20,4 minutos como un pico simple. Para almacenamiento enfriado, eluye un pequeño pico frontal en 15 minutos, el pico frontal corresponde a aproximadamente 1% de contenido total de MBL. Para almacenamiento congelado, el pico es idéntico a la referencia sin detección de pico frontal. La Figura 2 ilustra los cromatogramas SEC del patrón de referencia en la parte superior seguido por una muestra de estabilidad de 1 mg/ml mantenida a +4 grados y a -20 grados. Se detecta un pequeño pico frontal en la muestra mantenida enfriada correspondiente al 1% del contenido de MBL total.

PE305: Los datos de SEC de la formulación de 10 mg/ml indican generación de un pico frontal. La cantidad de MBL en el pico frontal se calcula por comparación con el contenido de MBL total y se ilustra en la tabla 3 como pico frontal en % de MBL total. Según la tabla 3, se detectan picos frontales en todas las muestras correspondientes al 3 al 5% de MBL total para almacenamiento a temperaturas congelada y enfriada. A +37 grados se observa 40% después de 2½ meses y está presente 56% en el pico frontal después de 5 meses de almacenamiento.

55

TABLA 3

La cantidad de MBL presente en el pico frontal en % de MBL total. Todas las mediciones son por duplicado

Tipo de almacenamiento	-20°C	+4°C	+37°C
T = 2½ meses	3,5% $\pm$ 1,6 (N=2)	5,3% $\pm$ 0,1 (N=2)	39,5% $\pm$ 3,0 (N=2)
T = 5 meses	4,1% $\pm$ 1,6 (N=2)	3,4% $\pm$ 2,1 (N=2)	56,5% $\pm$ 16,1 (N=2)

# ES 2 271 515 T3

PE0407: Se observan picos frontales en la formulación de 5 mg/ml con cantidades entre el 1 y el 3%. Un testigo sin calcio e incubado a +37 grados era el contenido de MBL en el pico frontal medido al 62%.

TABLA 4

5 *La cantidad de MBL presente en el pico frontal en % de MBL total. Todas las mediciones son estimaciones simples*

	Tipo de almacenamiento	-20°C	+4°C	+37°C	Testigo 37°C
10	T = 2 meses	2% (N=1)	1% (N=1)	3% (N=1)	62% (N=1)

## Datos de MS

15 PE238: Los análisis de espectrometría de masas en MBL reducido indican una cadena de polipéptido de MBL intacta durante 12 meses de almacenamiento a -20 y +4 grados, no se observan cambios después de 6 meses de almacenamiento a +37 grados. En la figura 3 se ilustran espectrogramas de MS.

20 No aparece MBL como un pico simple debido a diferentes perfiles de hidroxilación y glicosilación, produciendo normalmente un total de siete picos con el pico principal alrededor de 25.450 daltons. Los datos no indican cambios de desglicosilación o polipéptido con el tiempo de almacenamiento.

25 La Figura 3 muestra picos similares para la referencia y las muestras de 12 meses no indican cambios en la cadena de polipéptido de MBL durante el almacenamiento.

## Discusión

30 La formulación de 1 mg/ml es estable 12 meses bajo almacenamiento congelada sin cambios de la activación de C4, sin detectarse agregados y sin cambios de la cadena de polipéptido. Entre otros análisis realizados están AIEC para el contenido, manchas de western no reducido para distribución de tamaños, coloración de coomasie para detección de productos de degradación y análisis de aminoácidos para verificar el contenido. Ninguno de estos análisis indica ningún cambio después de 12 meses de almacenamiento a temperaturas de congelación y enfriamiento. Aproximadamente el 99% de la MBL total eluye de modo similar a la MBL de referencia después de 12 meses de almacenamiento a temperatura de enfriamiento. Para la formulación de 10 mg/ml, se detecta una disminución de la activación de C4 para todas las muestras analizadas a alrededor del 80% después de 2½ y 5 meses de almacenamiento a temperatura de congelación y enfriamiento, indicando que una vez que se ha concentrado MBL hasta 10 mg/ml, es estable. El valor de activación de C4 a tiempo cero se mide al 94%. Los análisis de SEC indican una cantidad agregada alrededor del 4% para 2½ y 5 meses de almacenamiento a temperatura de congelación y enfriamiento. La cantidad de agregado es constante con la temperatura y el tiempo de almacenamiento, indicando que podría estar presente agregado desde el comienzo del estudio en las formulaciones concentradas y es causado por la etapa de concentración más que por el almacenamiento. Cualquier formulación mayor que 1 mg/ml se ha preparado por concentración usando un dispositivo de filtración que expone la proteína a 3.500 x g. Una etapa del procedimiento extremadamente tensionante para cualquier proteína y un tratamiento que se sabe en general que ocasiona agregación de proteína.

45 La formulación de 5 mg/ml tiene resultados de activación de C4 entre el 91 y el 94% en comparación con la referencia para almacenamiento en congelación, enfriada e incluso a +37 grados. Se mide una formulación testigo sin calcio puesta a +37 grados al 19% de actividad después de dos meses de almacenamiento. La SEC detecta agregación con cantidades correspondientes al 1 a 3% del contenido de MBL total para muestras congelada y enfriada y 62% para el testigo a +37 grados. No se analizan muestras por Maldi-MS. Los datos de los tres estudios de estabilidad indican todos a MBL como una proteína excepcionalmente estable con almacenamiento congelado y enfriado. La conclusión final es que se ha desarrollado una formulación líquida de MBL de 1 mg/ml altamente estable para uso parenteral sin ningún excipiente estabilizante. La adición de calcio tiene un efecto drásticamente estabilizante en una formulación concentrada. Una formulación de 5 mg/ml almacenada durante dos meses a +37 grados sin ninguna pérdida de actividad es excepcional para formulaciones de proteínas.

## Ejemplo 9

### Ensayo de activación de C4

#### 60 *Revestimiento de placas FluoroNunc con Mannan*

Se revisten placas de microtitulación FluoroNunc con 100  $\mu$ l/pocillo de una solución que contiene 10  $\mu$ g/ml de Mannan (Sigma-Aldrich, polvo M7504) disuelto en tampón de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM pH 9,6 durante la noche a 20 ± 4°C en una cámara humidificada. Se lavan las placas dos veces en TBS (Tris (10 mM), NaCl (150 mM) pH 7,4) antes de bloquear las placas durante 1 hora a 20 ± 4°C con 200  $\mu$ l/pocillo de tampón TBS suplementado con 1 mg/ml de HSA (Statens Serum Institute, Copenhague). Cada pocillo se lava tres veces con tampón TBS.

# ES 2 271 515 T3

## *Ensayo de activación de C4*

Se purifica MASP de un individuo deficiente en MBL sin anticuerpos anti Mannan. El patrón de referencia rMBL se origina de un material de referencia de rMBL purificado que se ha prediluido en tampón LISA (Tris/Base (20 mM), 5 NaCl (150 mM), CaCl<sub>2</sub> (10 mM), HSA 1 mg/ml, Triton X-100 (0,05%), pH 7,4) hasta una concentración final de 100 µg/ml y se guarda a -80 grados Celsius.

El patrón rMBL y las muestras de ensayo se prediluyen a 5 µg/ml en tampón LISA. El patrón rMBL prediluido y las muestras se mezclan con la MASP en un volumen 1:1 y se incuban durante 10 min a 37 grados Celsius.

10 El factor de complemento de C4 se purifica de sangre reciente y se guarda congelado en C4, NaCl 1 M, Tris 20 mM, 6-amino-hexansiro 50 mM, EDTA 5 mM, 0,02% W7v NaN<sub>3</sub>, pH 7,4. Se descongela en hielo C4 y se diluye 1:2000 en tampón B1 (Barbital (16 mM), NaCl (580 mM), CaCl<sub>2</sub> (8 mM), MgCl<sub>2</sub> (4 mM) pH 7,4. N° de cat. 210050 Bie Berntsen). El complejo rMBL prediluido:MASP y las muestras de ensayo se diluyen 1:10 en el C4:tampón B1 y 15 se prepara una serie de dilución de diluciones de 2 veces.

La placa revestida de mannan se pone en hielo y se aplican las muestras a la placa. Se inicia la reacción cuando las muestras se transfieren al incubador a 37 grados Celsius.

20 Se incuba la placa durante 90 min a 37 grados Celsius en un incubador controlado y se lava tres veces en tampón TBST/Ca<sup>2+</sup> (Tris (10 mM), NaCl (150 mM), Tween-20 (0,05% p/v), CaCl<sub>2</sub> (100 mM) pH 7,4) en un lavador de placas. Se añaden 100 µl por pocillo de anticuerpo anti C4 humano marcado con biotina (anti-C4 humano de cabra, de DAKO) (1 µg/ml) diluido 1:1000 en tampón TBST/Ca<sup>2+</sup> y se incuba durante 90 min a 25 grados Celsius en una torre de calentamiento. Se lavan las placas tres veces en tampón TBST/Ca<sup>2+</sup> en un lavador de placas. Se diluyen 1:1000 100 µl por pocillo de solución de Europio-estreptavidina (Wallac 1244-360) en tampón de dilución de Europio (Tris (10 mM), NaCl (150 mM), Tween-20 (0,05%), EDTA (25 µM) y se incuba durante 60 min a 25 grados Celsius en una 25 torre de calentamiento. Se lavan las placas tres veces en tampón TBST/Ca<sup>2+</sup> en el lavador de placas. Se añaden 100 µl por pocillo de solución de Aumento (Wallac 1244-105) y se sacuden las muestras durante 5 min en un sacudidor de placas. Se sedimentan las muestras durante aproximadamente 5 min y se insertan en un Wallac Victor 2<sup>d</sup> Multicounter 30 1420. Se mide la fluorescencia de Eu<sup>3+</sup> usando el programa de Europio estándar.

Los datos obtenidos de la lectura del ensayo deben trazarse como sigue: La concentración de MBL en el eje x y las cuentas de Europio (las cpm) en el eje y. La concentración de MBL debe representarse como el log natural mientras que el Europio debe ser los datos lineales.

35 Para el análisis de datos y los cálculos de EC50 hay que usar la ecuación del coeficiente de Hill y 4 parámetros.

La eficacia relativa de la muestra de rMBL se determina a partir del patrón de referencia rMBL como sigue:

40 Eficacia relativa = (EC50 del patrón de referencia/EC50 del ensayo)\*100

## Ejemplo 10

### *45 Cromatografía de exclusión por tamaños (SEC)*

Todas las muestras para análisis deben estar exentas de precipitados visibles y prepararse en viales de HPLC usando tapones con diafragma. La solución de proteína se aplica a la columna de Superose a temperatura ambiente en un tampón basado en Tris (pH = 7,4).

50 La columna Superose 6 HR10/30 se entrega pre-rellena por Amersham Biosciences.

*La cromatografía se realiza según la siguiente especificación*

55	Tipo de resina	Superose 6
	Tamaño de resina	Superficie 0,78 cm <sup>2</sup> , Altura 30 cm
	Temperatura	25°C
60	Flujo de disolvente	38 cm/h (0,5 ml/min) durante la cromatografía completa
	Perfil de gradiente	Isocrático; 40 ml de tampón de elución por prueba, correspondiente a un tiempo de prueba de 80 min.
	Detección	280 nm (detección de proteína) Sensibilidad: Intervalo auxiliar=2, Intervalo=1, Respuesta=4 (!importante!)
65	Tiempo de prueba	80 min
	Frecuencia de muestreo	5 Hz (cada 0,2 s)

# ES 2 271 515 T3

## Disolventes

5	Tampón de elución (ACOPIO)	Tris (0,1 M) NaCl (1,4 M) NaN <sub>3</sub> (0,01% p/v)	Tris (24,2 g), NaCl (163,6 g) y 2,0 ml de natriumazid (10%) se disuelven en H <sub>2</sub> O(añadir 2000 ml) Durante el procedimiento, se ajusta el pH con HCl 5 M.
10	Tampón de elución	pH 7,4 (20°C) Tris (10 mM) NaCl (140 mM) NaN <sub>3</sub> (0,001% p/v)	Tiempo de almacenamiento estimado: Largo Tampón de elución (ACOPIO) (200 ml) se diluye en agua (añadir 2000 ml). Debe controlarse el pH en la solución final.
15	Tampón de regeneración (Ácido)	pH 7,4 (20°C) HCl (0,1 M)	Tiempo de almacenamiento estimado: Medio HCl (5 M, 10 ml) se disuelve en H <sub>2</sub> O (añadir 500 ml)
20	Tampón de regeneración (Alcalino)	NaOH (0,5 M)	Tiempo de almacenamiento estimado: Largo NaOH (20 g) se disuelve en H <sub>2</sub> O (añadir 1000 ml).
25			Tiempo de almacenamiento estimado: Largo

## Referencias

- Akers, J.M. y Defelippis, R.M., 2000, Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, redactado por S. Frokjaer y L. Hogaard, págs. 166-167, Londres: Taylor y Francis.
- Davies, E.J., Snowden, N., Hillarby, M.C., Carthy, D., Grennan, D.M., Thomson, W. y Ollier, W.E.R. Mannose-binding protein gene polymorphism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **38**, 110-114 (1995).
- Frokjaer, S. y Hovgaard, L., Pharmaceutical formulation development of peptides and proteins, Taylor y Francis, págs. 100-109.
- Garred, P., Madsen, H.O., Hofmann, B. & Svejgaard, A. Increased frequency of homozygosity of abnormal mannan-binding-proteins alleles in patients with suspected immunodeficiency. *Lancet* **346**, 941-943 (1995).
- Garred, P., Madsen, H.O., Balslev, U., Hofmann, B., Pedersen, C., Gerstoft, J. y Svelgaard, A. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. *Lancet* **349**, 236-240 (1997).
- Ji, Y-H. et al. Activation of the C4 and C2 components of complement by a proteinase in serum bactericidal factor, Ra reactive factor *J. Immunol.* **150**, 571-578 (1993).
- Kawasaki, N., T. & Yamashina, I. A serum lectin (mannan-binding protein) has complement-dependent bactericidal activity. *J. Biochem.* **106**, 483-489 (1989).
- Kilpatrick, D.C., Bevan, B.H. y Liston, W.A. Association between mannan-binding protein deficiency and recurrent miscarriage. *Mol. Hum. Reprod.* **1**, 2501-2505 (1995).
- Kuhlman, M., Joiner, K. & Ezekowitz, R.A.B. The human mannose-binding protein functions as an opsonin. *J. Exp. Med.* **169**, 1733-1745 (1989).
- Lipscombe, R.J. et al. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum. Mol. Genet.* **1**, 709-715 (1992).
- Lipscombe, R.J. et al. Distinct physicochemical characteristics of human mannose binding protein expressed by individuals of differing genotype, *Immunology* **85** (1995) 660-667.
- Madsen H.O. et al. A new frequent allele in the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics* **40**, 37-44 (1994).
- Malhotra, R., Wormald, M.R., Rudd, P.M., Fischer, P.B., Dwek, R.A. y Sim, R.B. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nature Med.* **1**, 237-243 (1995).

ES 2 271 515 T3

- 5      **Matsushita, M. & Fujita, T.** 4) Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease *J. Exp. Med.* **176**, 1497-1502 (1992).
- 10     **Nema S, Washkuhn RJ y Bendel RJ, 1997, Journal of Pharmaceutical Science & Technology, 51:166-171.**
- 15     **Nielsen, S.L., Andersen, P.L., Koch, C., JENSENIUS, J.C. & Thiel, S.** The level of the serum opsonin, mannann-binding protein in HIV-1 antibody-positive patients. *Clin. Exp. Immunol.* **100**, 219-222 (1995).
- 20     **Sumiya, M. et al.** Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet* **337**, 1569-1570 (1991).
- 25     **Super, M., Thiel, S., Lu, J., Levinsky, R.J. & Turner, M.W.** Association of low levels of mannann-binding protein with a common defect of opsonisation, *Lancet* **ii**, 1236-1239 (1989).
- 30     **Summerfield, J.A. et al.** Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. *Lancet* **345**, 886-889 (1995).
- 35     **Thiel, S., Vorup-Jensen, T., Stover, C.M., Schwable, W., Laursen, S.B., Poulsen, K., Willis, A.C., Eggleton, P., Hansen, S., Holmskov, U., Reid, K.B.M., JENSENIUS, J.C. (1997)**. A second serine protease associated with mannann-binding lectin that activates complement, *Nature*, **386**, 506-510.
- 40     **Turner, M.W.** Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol. Today*, **17**, 532-540 (1996).
- 45     **Valdimarson et al., 1998, Scand. J. Immunol.** 48:116-123.
- 50     **Vorup-Jensen T et al.: Recombinant expression of human mannann-binding lectin, Int Immunoopharm** **1** (2001) 677-687.
- 55
- 60
- 65

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición farmacéutica que comprende aditivos aceptables farmacéuticamente y

5 a) al menos 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteína total, en la que lectina de unión a mannan (MBL) y/o variantes de MBL constituyen al menos el 35% (p/p) de la proteína total, y en la que no se añade a dicha composición estabilizante que contenga proteína; o

10 b) al menos 1.000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de lectina de unión a mannan (MBL) y/o variantes de MBL

en la que las variantes de MBL son polipéptidos al menos 75% homólogos a SEQ ID 1.

2. La composición según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en la que la composición es una solución de proteína.

15 3. La composición según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en la que la composición es una suspensión de proteína.

4. La composición según alguna de las reivindicaciones 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup>, en la que la solución o suspensión está congelada.

20 5. La composición según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en la que la composición es una composición seca, que comprende proteína liofilizada.

6. La composición según la reivindicación 5<sup>a</sup>, en la que dicha composición seca es capaz de reconstituirse en una solución.

25 7. La composición según alguna de las reivindicaciones 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> y 6<sup>a</sup>, en la que dicha solución o suspensión es adecuada para administración por inyección o infusión.

30 8. La composición según alguna de las reivindicaciones 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> y 6<sup>a</sup>, en la que dicha solución o suspensión es adecuada para administración como inyección de bolus.

9. La composición según alguna de las reivindicaciones 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> y 6<sup>a</sup>, en la que dicha solución o suspensión es adecuada para administración por inyección o infusión intravenosa.

35 10. La composición según alguna de las reivindicaciones 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> y 6<sup>a</sup>, en la que dicha solución o suspensión es adecuada para administración por inyección subcutánea.

11. La composición según alguna de las reivindicaciones 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> y 6<sup>a</sup>, en la que dicha solución o suspensión es adecuada para administración por inyección intramuscular.

40 12. La composición según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en la que la composición comprende al menos 750  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de material que contiene proteína o sales del mismo.

45 13. La composición según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en la que MBL o sales de MBL constituyen al menos el 50% (p/p) de la proteína total.

14. La composición según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en la que la proteína total comprende además una o más serina proteasa asociada a MBL (MASP).

50 15. La composición según la reivindicación 14<sup>a</sup>, en la que MASP se selecciona del grupo constituido por MASP-1 de SEQ ID NO: 2, MASP-2 de SEQ ID NO: 3, MASP-3 de SEQ ID NO: 4 y equivalentes funcionales de las mismas al menos 75% homólogos a las secuencias respectivas.

16. La composición según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en la que MBL es MBL de suero humano de origen natural purificada.

55 17. La composición según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en la que MBL se ha producido recombinantemente.

18. La composición según la reivindicación 17<sup>a</sup>, en la que más del 50% de MBL es mayor de 200 kDa determinado por SDS-PAGE no reductora.

60 19. La composición según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en la que al menos un aditivo aceptable farmacéuticamente es un agente isotónico.

65 20. La composición según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en la que al menos un aditivo aceptable farmacéuticamente es un tampón.

## ES 2 271 515 T3

21. La composición según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en la que no se añade a dicha composición estabilizante que contenga proteína.
- 5        22. La composición según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en la que la composición comprende además un catión divalente.
23. La composición según la reivindicación 22<sup>a</sup>, en la que el catión divalente es Ca<sup>2+</sup>.
- 10      24. La composición según la reivindicación 7<sup>a</sup>, en la que los aditivos aceptables farmacéuticamente comprenden uno o más seleccionados del grupo constituido por sal isotónica, sal hipertónica y tampón.
- 15      25. La composición según la reivindicación 5<sup>a</sup>, en la que los aditivos aceptables farmacéuticamente comprenden uno o más seleccionados del grupo constituido por agentes isotónicos, tampón y agentes crioprotectores.
- 15      26. La composición según la reivindicación 5<sup>a</sup>, en la que los aditivos aceptables farmacéuticamente comprenden glucosa monohidrato, glicina, NaCl y polietilenglicol 3350.
- 20      27. La composición según alguna de las reivindicaciones 20<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup> y 25<sup>a</sup>, en la que el tampón es capaz de tamponar una solución en un pH en el intervalo de 6 a 8.
- 20      28. La composición según alguna de las reivindicaciones 20<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup> y 25<sup>a</sup>, en la que el tampón se selecciona del grupo constituido por tampón TRIS, fosfato, citrato, carbonato, glicinato, histidina, glicina, succinato y trietanolamina.
- 25      29. La composición según la reivindicación 19<sup>a</sup>, en la que la composición es isotónica, hipotónica o hipertónica.
- 25      30. La composición según alguna de las reivindicaciones 19<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup> y 25<sup>a</sup>, en la que el agente isotónico se selecciona del grupo constituido por NaCl, CaCl<sub>2</sub>, KCl, MgCl<sub>2</sub>, manitol y glicerol.
- 30      31. La composición según la reivindicación 25<sup>a</sup>, en la que dicho agente crioprotector se selecciona del grupo constituido por dextrano, polietilenglicol, sacarosa, trehalosa y manitol.
- 30      32. La composición según la reivindicación 7<sup>a</sup>, en la que la composición se ha esterilizado.
- 35      33. La composición según la reivindicación 7<sup>a</sup>, en la que la composición se ha sometido a una etapa de reducción de virus.
- 35      34. La composición según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en la que la composición no comprende detergentes.
- 35      35. La composición según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en la que la composición no comprende estabilizantes.
- 40      36. Una composición farmacéutica que comprende aditivos aceptables farmacéuticamente; y lectina de unión a mannan (MBL) y/o variantes de MBL; y al menos un catión divalente; en la que las variantes de MBL son polipéptidos al menos 75% homólogos a SEQ ID 1.
- 45      37. La composición según la reivindicación 36<sup>a</sup>, en la que la composición comprende en el intervalo de 0,01 mM a 1.000 mM de catión divalente.
- 45      38. La composición según la reivindicación 36<sup>a</sup>, en la que el catión divalente es Ca<sup>2+</sup>.
- 50      39. La composición según la reivindicación 36<sup>a</sup>, en la que la concentración de lectina de unión a mannan (MBL) y/o variantes de MBL es al menos 1 mg/ml.
- 55      40. Un procedimiento para preparar una composición farmacéutica según alguna de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 39<sup>a</sup>, que comprende las etapas de
- 55      a) proporcionar lectina de unión a mannan (MBL) y/o variantes de MBL; en la que las variantes de MBL son polipéptidos al menos 75% homólogos a SEQ ID 1;
- 60      b) mezclar dicha MBL y/o variantes de MBL con aditivos aceptables farmacéuticos y opcionalmente con cationes divalentes
- 60      c) y obtener por ello una composición farmacéutica según alguna de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 39<sup>a</sup>.
- 65      41. El uso de una composición según alguna de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 39<sup>a</sup>, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un estado clínico en un individuo que lo necesite, en el que el estado clínico se selecciona del grupo constituido por infecciones, deficiencia de MBL y estados inmunocomprometidos.
- 65      42. El uso según la reivindicación 41<sup>a</sup>, en el que el estado clínico es una infección.

# ES 2 271 515 T3

43. El uso según la reivindicación 41<sup>a</sup>, en el que el individuo es un ser humano.

44. El uso según la reivindicación 41<sup>a</sup>, en el que el individuo es un ser humano que padece un riesgo aumentado de adquirir una infección.

5

45. El uso según la reivindicación 41<sup>a</sup>, en el que el individuo es un ser humano con nivel de MBL en suero subnormal.

10

15

20

25

30

35

40

45

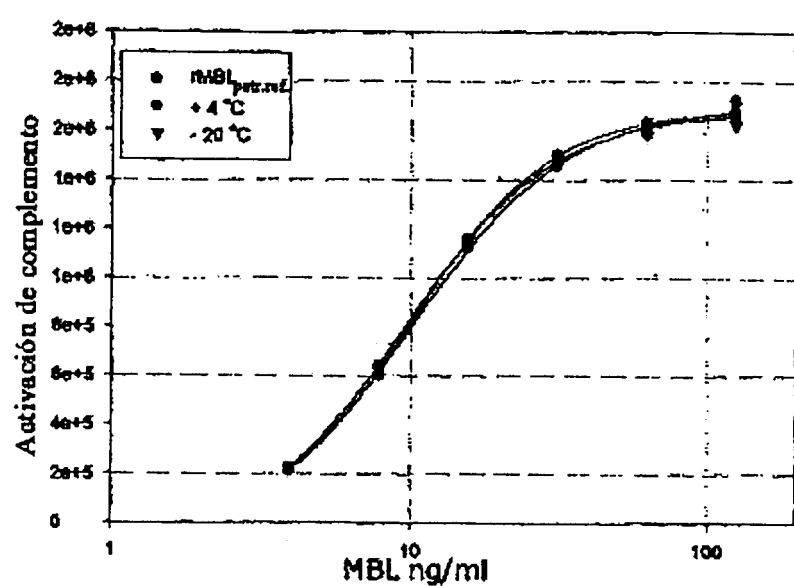
50

55

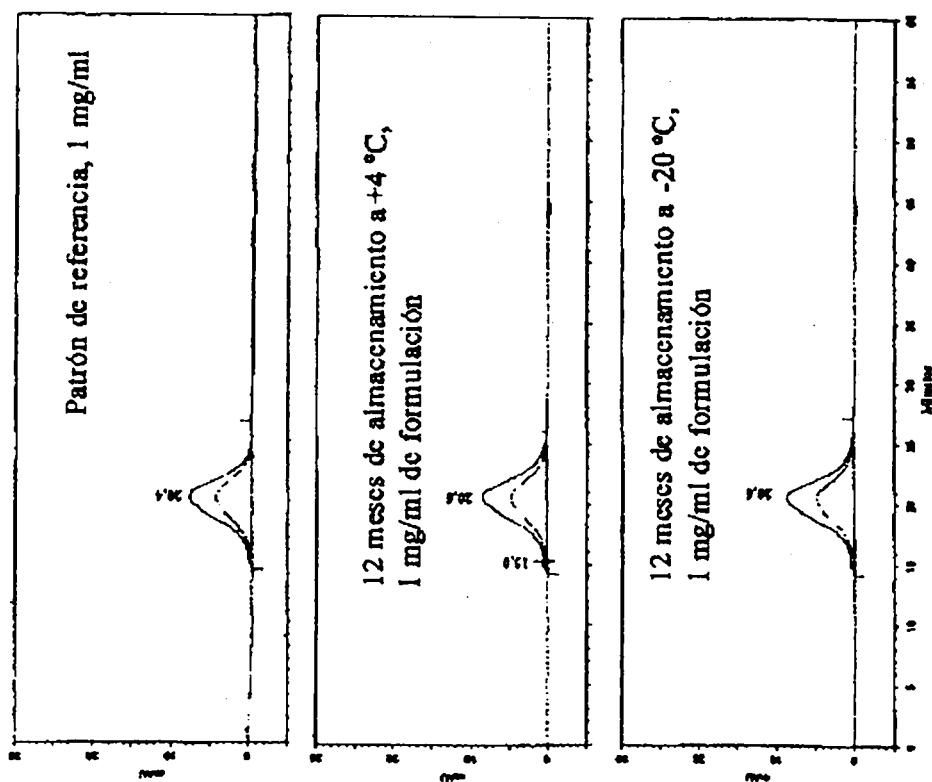
60

65

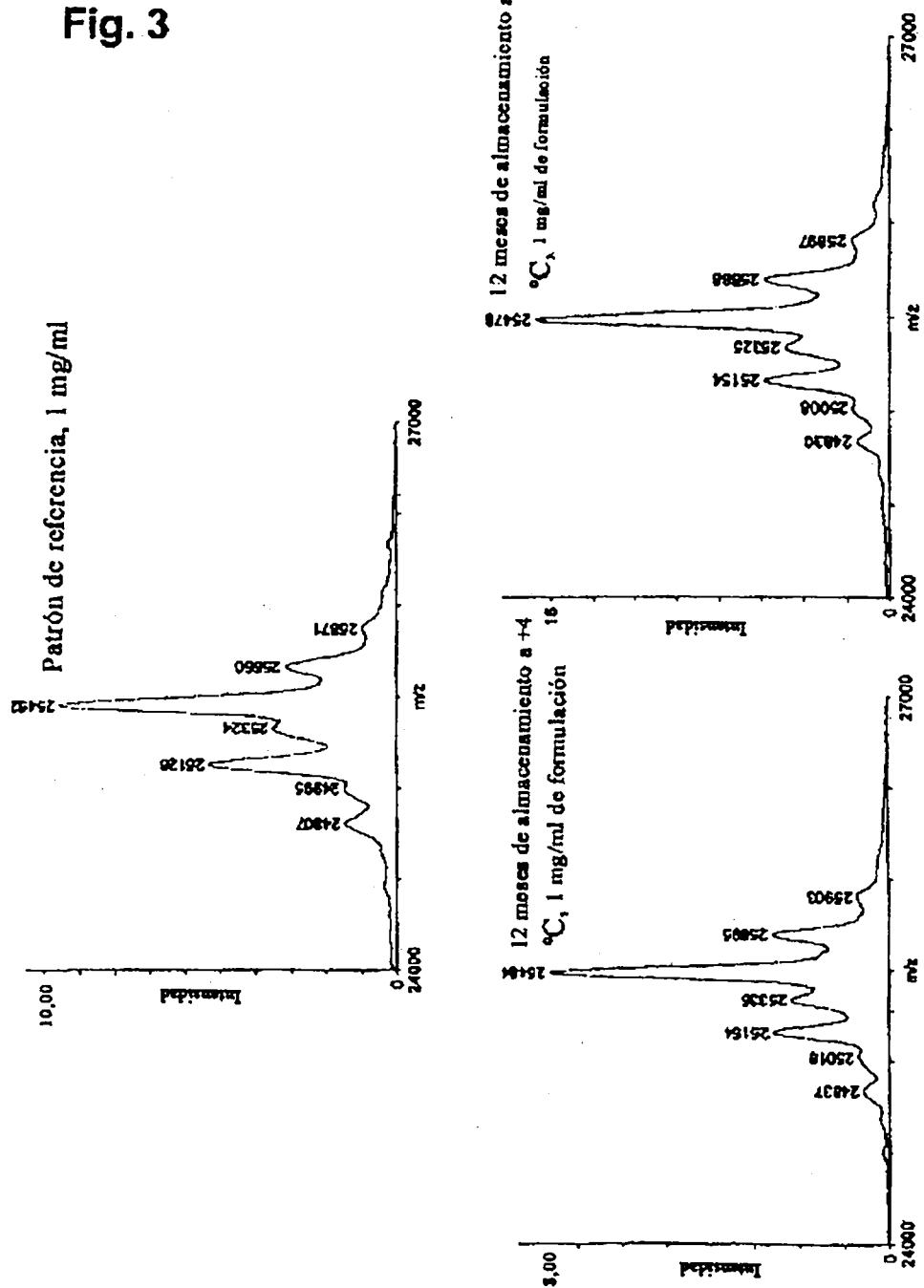
**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**



# ES 2 271 515 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> NatImmune

5 <120> Composiciones farmacéuticas que comprenden lectina de unión a manosa

<130> P 625 DK00

10 <160> 4

<170> PatentIn versión 3.1

15 <210> 1

<211> 248

<212> PRT

20 <213> *Homo Sapiens*

<410> 1

Met Ser Leu Phe Pro Ser Leu Pro Leu Leu Leu Ser Met Val Ala  
25 1 5 10 15

Ala Ser Tyr Ser Glu Thr Val Thr Cys Glu Asp Ala Gln Lys Thr Cys  
30 20 25 30

Pro Ala Val Ile Ala Cys Ser Ser Pro Gly Ile Asn Gly Phe Pro Gly  
35 35 40 45

Lys Asp Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Gln  
35 50 55 60

Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Lys Leu Gly Pro Pro Gly  
40 65 70 75 80

Asn Pro Gly Pro Ser Gly Ser Pro Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Asp  
45 85 90 95

Pro Gly Lys Ser Pro Asp Gly Asp Ser Ser Leu Ala Ala Ser Glu Arg  
50 100 105 110

Lys Ala Leu Gln Thr Glu Met Ala Arg Ile Lys Lys Trp Leu Thr Phe  
55 115 120 125

Ser Leu Gly Lys Gln Val Gly Asn Lys Phe Phe Leu Thr Asn Gly Glu  
60

65

## ES 2 271 515 T3

	130	135	140
5	Ile Met Thr Phe Glu Lys Val Lys Ala Leu Cys Val Lys Phe Gln Ala		
	145	150	155
10	Ser Val Ala Thr Pro Arg Asn Ala Ala Glu Asn Gly Ala Ile Gln Asn		
	165	170	175
15	Leu Ile Lys Glu Glu Ala Phe Leu Gly Ile Thr Asp Glu Lys Thr Glu		
	180	185	190
20	Gly Gln Phe Val Asp Leu Thr Gly Asn Arg Leu Thr Tyr Thr Asn Trp		
	195	200	205
25	Asn Glu Gly Glu Pro Asn Asn Ala Gly Ser Asp Glu Asp Cys Val Leu		
	210	215	220
30	Leu Leu Lys Asn Gly Gln Trp Asn Asp Val Pro Cys Ser Thr Ser His		
	225	230	235
	Leu Ala Val Cys Glu Phe Pro Ile		
	245		
35	<210> 2		
	<211> 699		
	<212> PRT		
	<213> <i>Homo Sapiens</i>		
	<400> 2		
40	Met Arg Trp Leu Leu Tyr Tyr Ala Leu Cys Phe Ser Leu Ser Lys		
	1	5	10
45	Ala Ser Ala His Thr Val Glu Leu Asn Asn Met Phe Gly Gln Ile Gln		
	20	25	30
50	Ser Pro Gly Tyr Pro Asp Ser Tyr Pro Ser Asp Ser Glu Val Thr Trp		
	35	40	45
55	Asn Ile Thr Val Pro Asp Gly Phe Arg Ile Lys Leu Tyr Phe Met His		
	50	55	60
60	Phe Asn Leu Glu Ser Ser Tyr Leu Cys Glu Tyr Asp Tyr Val Lys Val		
	65	70	75
	85		80
65	Glu Thr Glu Asp Gln Val Leu Ala Thr Phe Cys Gly Arg Glu Thr Thr		
	100	105	95
	Asp Thr Glu Gln Thr Pro Gly Gln Glu Val Val Leu Ser Pro Gly Ser		
	110		

# ES 2 271 515 T3

Phe Met Ser Ile Thr Phe Arg Ser Asp Phe Ser Asn Glu Glu Arg Phe  
 115 120 125

5 Thr Gly Phe Asp Ala His Tyr Met Ala Val Asp Val Asp Glu Cys Lys  
 130 135 140

10 Glu Arg Glu Asp Glu Glu Leu Ser Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr  
 145 150 155 160

15 Ile Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Phe Gly Tyr Ile Leu His Thr  
 165 170 175

20 Asp Asn Arg Thr Cys Arg Val Glu Cys Ser Asp Asn Leu Phe Thr Gln  
 180 185 190

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

25 Ser Ser Glu Cys Leu Tyr Thr Ile Glu Leu Glu Glu Gly Phe Met Val  
 210 215 220

30 Asn Leu Gln Phe Glu Asp Ile Phe Asp Ile Glu Asp His Pro Glu Val  
 225 230 235 240

35 Pro Cys Pro Tyr Asp Tyr Ile Lys Ile Lys Val Gly Pro Lys Val Leu  
 245 250 255

40 Gly Pro Phe Cys Gly Glu Lys Ala Pro Glu Pro Ile Ser Thr Gln Ser  
 260 265 270

His Ser Val Leu Ile Leu Phe His Ser Asp Asn Ser Gly Glu Asn Arg  
 275 280 285

45 Gly Trp Arg Leu Ser Tyr Arg Ala Ala Gly Asn Glu Cys Pro Glu Leu  
 290 295 300

50 Gln Pro Pro Val His Gly Lys Ile Glu Pro Ser Gln Ala Lys Tyr Phe  
 305 310 315 320

55 Phe Lys Asp Gln Val Leu Val Ser Cys Asp Thr Gly Tyr Lys Val Leu  
 325 330 335

60 Lys Asp Asn Val Glu Met Asp Thr Phe Gln Ile Glu Cys Leu Lys Asp  
 340 345 350

65 Gly Thr Trp Ser Asn Lys Ile Pro Thr Cys Lys Ile Val Asp Cys Arg  
 355 360 365

Ala Pro Gly Glu Leu Glu His Gly Leu Ile Thr Phe Ser Thr Arg Asn  
 370 375 380

ES 2 271 515 T3

Asn	Leu	Thr	Thr	Tyr	Lys	Ser	Glu	Ile	Lys	Tyr	Ser	Cys	Gln	Glu	Pro
385					390					395					400
Tyr	Tyr	Lys	Met	Leu	Asn	Asn	Asn	Thr	Gly	Ile	Tyr	Thr	Cys	Ser	Ala
					405				410					415	
Gln	Gly	Val	Trp	Met	Asn	Lys	Val	Leu	Gly	Arg	Ser	Leu	Pro	Thr	Cys
					420			425					430		
Leu	Pro	Val	Cys	Gly	Leu	Pro	Lys	Phe	Ser	Arg	Lys	Leu	Met	Ala	Arg
					435			440					445		
Ile	Phe	Asn	Gly	Arg	Pro	Ala	Gln	Lys	Gly	Thr	Thr	Pro	Trp	Ile	Ala
					450			455					460		
Met	Leu	Ser	His	Leu	Asn	Gly	Gln	Pro	Phe	Cys	Gly	Gly	Ser	Leu	Leu
					465			470			475			480	
Gly	Ser	Ser	Trp	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	His	Gln	Ser	Leu
					485				490				495		
Asp	Pro	Lys	Asp	Pro	Thr	Leu	Arg	Asp	Ser	Asp	Leu	Leu	Ser	Pro	Ser
					500			505					510		
Asp	Phe	Lys	Ile	Ile	Leu	Gly	Lys	His	Trp	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Glu
					515			520					525		
Asn	Glu	Gln	His	Leu	Gly	Val	Lys	His	Thr	Thr	Leu	His	Pro	Lys	Tyr
					530			535			540				
Asp	Pro	Asn	Thr	Phe	Glu	Asn	Asp	Val	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Leu	Glu
					545			550			555			560	
Ser	Pro	Val	Leu	Asn	Ala	Phe	Val	Met	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Glu	Gly
					565			570					575		
Pro	Gln	Gln	Glu	Gly	Ala	Met	Val	Ile	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Lys	Gln
					580			585					590		
Phe	Leu	Gln	Arg	Phe	Pro	Glu	Thr	Leu	Met	Glu	Ile	Glu	Ile	Pro	Ile
					595			600			605				
Val	Asp	His	Ser	Thr	Cys	Gln	Lys	Ala	Tyr	Ala	Pro	Leu	Lys	Lys	Lys
					610			615				620			
Val	Thr	Arg	Asp	Met	Ile	Cys	Ala	Gly	Glu	Lys	Glu	Gly	Gly	Lys	Asp
					625			630			635			640	
Ala	Cys	Ser	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Met	Val	Thr	Leu	Asn	Arg	Glu
					645				650				655		

# ES 2 271 515 T3

Arg Gly Gln Trp Tyr Leu Val Gly Thr Val Ser Trp Gly Asp Asp Cys  
 660 665 670

5 Gly Lys Lys Asp Arg Tyr Gly Val Tyr Ser Tyr Ile His His Asn Lys  
 675 680 685

10 Asp Trp Ile Gln Arg Val Thr Gly Val Arg Asn  
 690 695

<210> 3

<211> 686

15 <212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 3

20 Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr  
 1 5 10 15

25 Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser  
 20 25 30

30 Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr  
 35 40 45

35 Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe  
 50 55 60

40 Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser  
 65 70 75 80

45 Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp  
 85 90 95

50 Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser  
 100 105 110

55 Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr  
 115 120 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val  
 130 135 140

55 Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu  
 145 150 155 160

60 Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn  
 165 170 175

65 Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gln Arg

## ES 2 271 515 T3

	180	185	190
5	Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys Leu 195                    200                    205		
10	Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu Glu Gly Phe Ser Val Ile 210                    215                    220		
15	Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr Leu 225                    230                    235                    240		
20	Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His Gly 245                    250                    255		
25	Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg Ile Glu Thr Lys Ser Asn 260                    265                    270		
30	Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu Ser Gly Asp His Thr Gly 275                    280                    285		
35	Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala His Ala Cys Pro Tyr Pro Met 290                    295                    300		
40	Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val Gln Ala Lys Tyr Ile Leu 305                    310                    315                    320		
45	Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr Gly Tyr Glu Leu Leu Gln 325                    330                    335		
50	Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly 340                    345                    350		
55	Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser Ile Val Asp Cys Gly Pro 355                    360                    365		
60	Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu Tyr Ile Thr Gly Pro Gly 370                    375                    380		
65	Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe 385                    390                    395                    400		
	Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly 405                    410                    415		
	Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Glu Pro 420                    425                    430		
	Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly Gly Arg Ile Tyr Gly Gly 435                    440                    445		
	Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Ile Leu Gly 450                    455                    460		

# ES 2 271 515 T3

Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr Asp Asn Trp Val Leu Thr  
 465                          470                          475                          480

5                            Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala Ser Ala Leu Asp  
                                 485                          490                          495

10                          Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln Ala  
                                 500                          505                          510

15                          Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Asp Ala Gly  
                                 515                          520                          525

20                          Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn Lys Val Val Ile  
                                 530                          535                          540

25                          Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Glu Ser  
                                 545                          550                          555                          560

30                          Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly Trp Gly Leu Thr  
                                 565                          570                          575

35                          Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val Asp Ile Pro Ile  
                                 580                          585                          590

40                          Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr Pro  
                                 595                          600                          605

45                          Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser Gly  
                                 610                          615                          620

50                          Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu  
                                 625                          630                          635                          640

55                          Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly  
                                 645                          650                          655

60                          Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val  
                                 660                          665                          670

65                          Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser Asp Phe  
                                 675                          680                          685

<210> 4

<211> 728

60 <212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

ES 2 271 515 T3

<400> 4  
Met Arg Trp Leu Leu Leu Tyr Tyr Ala Leu Cys Phe Ser Leu Ser Lys  
1 5 10 15  
  
Ala Ser Ala His Thr Val Glu Leu Asn Asn Met Phe Gly Gln Ile Gln  
20 25 30  
  
Ser Pro Gly Tyr Pro Asp Ser Tyr Pro Ser Asp Ser Glu Val Thr Trp  
35 40 45  
  
Asn Ile Thr Val Pro Asp Gly Phe Arg Ile Lys Leu Tyr Phe Met His  
50 55 60  
  
Phe Asn Leu Glu Ser Ser Tyr Leu Cys Glu Tyr Asp Tyr Val Lys Val  
65 70 75 80  
  
Glu Thr Glu Asp Gln Val Leu Ala Thr Phe Cys Gly Arg Glu Thr Thr  
85 90 95  
  
Asp Thr Glu Gln Thr Pro Gly Gln Glu Val Val Leu Ser Pro Gly Ser  
100 105 110  
  
Phe Met Ser Ile Thr Phe Arg Ser Asp Phe Ser Asn Glu Glu Arg Phe  
115 120 125  
  
Thr Gly Phe Asp Ala His Tyr Met Ala Val Asp Val Asp Glu Cys Lys  
130 135 140  
  
Glu Arg Glu Asp Glu Glu Leu Ser Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr  
145 150 155 160  
  
Ile Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Phe Gly Tyr Ile Leu His Thr  
165 170 175  
  
Asp Asn Arg Thr Cys Arg Val Glu Cys Ser Asp Asn Leu Phe Thr Gln  
180 185 190  
  
Arg Thr Gly Val Ile Thr Ser Pro Asp Phe Pro Asn Pro Tyr Pro Lys  
195 200 205  
  
Ser Ser Glu Cys Leu Tyr Thr Ile Glu Leu Glu Glu Gly Phe Met Val  
210 215 220  
  
Asn Leu Gln Phe Glu Asp Ile Phe Asp Ile Glu Asp His Pro Glu Val  
225 230 235 240  
  
Pro Cys Pro Tyr Asp Tyr Ile Lys Ile Lys Val Gly Pro Lys Val Leu  
245 250 255  
  
Gly Pro Phe Cys Gly Glu Lys Ala Pro Glu Pro Ile Ser Thr Gln Ser  
260 265 270

### ES 2 271 515 T3

	His Ser Val Leu Ile Leu Phe His Ser Asp Asn Ser Gly Glu Asn Arg			
	275	280	285	
5	Gly Trp Arg Leu Ser Tyr Arg Ala Ala Gly Asn Glu Cys Pro Glu Leu			
	290	295	300	
10	Gln Pro Pro Val His Gly Lys Ile Glu Pro Ser Gln Ala Lys Tyr Phe			
	305	310	315	320
15	Phe Lys Asp Gln Val Leu Val Ser Cys Asp Thr Gly Tyr Lys Val Leu			
	325	330	335	
	Lys Asp Asn Val Glu Met Asp Thr Phe Gln Ile Glu Cys Leu Lys Asp			
	340	345	350	
20	Gly Thr Trp Ser Asn Lys Ile Pro Thr Cys Lys Ile Val Asp Cys Arg			
	355	360	365	
25	Ala Pro Gly Glu Leu Glu His Gly Leu Ile Thr Phe Ser Thr Arg Asn			
	370	375	380	
30	Asn Leu Thr Thr Tyr Lys Ser Glu Ile Lys Tyr Ser Cys Gln Glu Pro			
	385	390	395	400
	Tyr Tyr Lys Met Leu Asn Asn Asn Thr Gly Ile Tyr Thr Cys Ser Ala			
	405	410	415	
35	Gln Gly Val Trp Met Asn Lys Val Leu Gly Arg Ser Leu Pro Thr Cys			
	420	425	430	
40	Leu Pro Glu Cys Gly Gln Pro Ser Arg Ser Leu Pro Ser Leu Val Lys			
	435	440	445	
45	Arg Ile Ile Gly Gly Arg Asn Ala Glu Pro Gly Leu Phe Pro Trp Gln			
	450	455	460	
50	Ala Leu Ile Val Val Glu Asp Thr Ser Arg Val Pro Asn Asp Lys Trp			
	465	470	475	480
	Phe Gly Ser Gly Ala Leu Leu Ser Ala Ser Trp Ile Leu Thr Ala Ala			
	485	490	495	
55	His Val Leu Arg Ser Gln Arg Arg Asp Thr Thr Val Ile Pro Val Ser			
	500	505	510	
60	Lys Glu His Val Thr Val Tyr Leu Gly Leu His Asp Val Arg Asp Lys			
	515	520	525	
65	Ser Gly Ala Val Asn Ser Ser Ala Ala Arg Val Val Leu His Pro Asp			
	530	535	540	
	Phe Asn Ile Gln Asn Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Val Gln Leu Gln			

## ES 2 271 515 T3

545	550	555	560
5 Glu Pro Val Pro Leu Gly Pro His Val Met Pro Val Cys Leu Pro Arg	565	570	575
10 Leu Glu Pro Glu Gly Pro Ala Pro His Met Leu Gly Leu Val Ala Gly	580	585	590
15 Trp Gly Ile Ser Asn Pro Asn Val Thr Val Asp Glu Ile Ile Ser Ser	595	600	605
20 Gly Thr Arg Thr Leu Ser Asp Val Leu Gln Tyr Val Lys Leu Pro Val	610	615	620
25 Val Pro His Ala Glu Cys Lys Thr Ser Tyr Glu Ser Arg Ser Gly Asn	625	630	635
			640
30 Tyr Ser Val Thr Glu Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Tyr Glu Gly Gly	645	650	655
35 Lys Asp Thr Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Ala Phe Val Ile Phe Asp	660	665	670
40 Asp Leu Ser Gln Arg Trp Val Val Gln Gly Leu Val Ser Trp Gly Gly	675	680	685
45 Pro Glu Glu Cys Gly Ser Lys Gln Val Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val	690	695	700
50 Ser Asn Tyr Val Asp Trp Val Trp Glu Gln Met Gly Leu Pro Gln Ser	705	710	715
			720
55 Val Val Glu Pro Gln Val Glu Arg	725		
60			
65			