



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021001017-3 A2



(22) Data do Depósito: 19/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 04/05/2021

(54) Título: COMPOSIÇÕES DE ANTICORPOS FCRN E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS

(51) Int. Cl.: A61K 31/7016; A61K 39/395; A61K 39/44; A61K 47/02; A61K 47/06; (...).

(30) Prioridade Unionista: 20/07/2018 US 62/701,467.

(71) Depositante(es): MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC.; ZHONGLI ZHANG; GREGORY ST. LOUIS.

(72) Inventor(es): ZHONGLI ZHANG; GREGORY ST. LOUIS; EVA WILLIAMS; NARINDER SINGH; SIDDHESH PATIL.

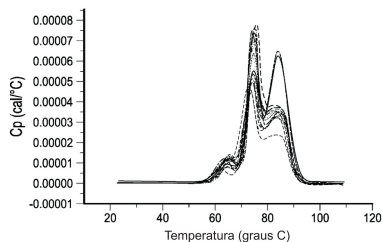
(86) Pedido PCT: PCT US2019042597 de 19/07/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/023310 de 30/01/2020

(85) Data da Fase Nacional: 19/01/2021

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES DE ANTICORPOS FCRN E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS. A presente invenção refere-se a composições farmacêuticas estáveis contendo um anticorpo anti-FcRn que são descritas e caracterizadas.

--- 235-20150301	..... 235-20150310
--- 235-20150302	..... 235-20150311
--- 235-20150303	..... 235-20150312
--- 235-20150304	..... 235-20150313
..... 235-20150305	..... 235-20150314
..... 235-20150306	..... 235-20150315
..... 235-20150307	..... 235-20150316
..... 235-20150308	..... 235-20150317
..... 235-20150309	..... 235-20150318



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"COMPOSIÇÕES DE ANTICORPOS FCRN E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS".**

**Antecedentes**

[0001] Numerosas doenças autoimunes e aloimunes são mediadas por anticorpos patogênicos. A estabilidade, a atividade e o transporte de anticorpos patogênicos dependem do receptor de Fc (FcRn), uma proteína transmembrana do tipo I que funciona como uma proteína de tráfego vesicular intracelular de ligação a albumina sérica e a IgG. Por exemplo, muitas doenças imunes fetais e neonatais resultam da transferência de anticorpos maternos de uma gestante, especialmente uma gestante com uma doença imunológica, para o feto através do receptor de Fc neonatal humano (FcRn) na placenta.

**Sumário**

[0002] Esta descrição refere-se a composições compreendendo um anticorpo anti-FcRn (composições M281) e métodos de uso de tais composições no tratamento de doenças autoimunes.

[0003] É no presente documento descrita uma composição farmacêutica que inclui: um anticorpo incluindo uma cadeia pesada que inclui a sequência de aminoácidos de SEQ ID N<sup>o</sup>: 2 com até 5 inserções, substituições ou deleções de aminoácidos simples e uma cadeia leve que inclui a sequência de aminoácidos de SEQ ID N<sup>o</sup>: 1 com até 5 inserções, substituições ou deleções de aminoácidos simples a 10 ou 30 mg/ml, fosfato de sódio 20 a 30 mM, cloreto de sódio 20 a 30 mM, trealose 80 a 100 (por exemplo, 90 a 91 mg/ml) e Polissorbato 80 0,1 a 0,005% peso/volume, tamponado em pH 6,5.

[0004] Em vários casos, a composição: inclui fosfato de sódio 25 mM; cloreto de sódio 25 mM; Trealose 90 a 91 mg/ml; trealose 90,5 mg/ml; Polissorbato 80 0,01% peso/volume; inclui fosfato de sódio 25 mM, cloreto de sódio 25 mM, trealose 90,5 mg/ml e Polissorbato 80

0,01%; a composição não contém quaisquer excipientes adicionais; a composição não inclui nenhum polissorbato diferente de polissorbato 80, a composição não inclui nenhum polímero diferente de um polissorbato, a composição não inclui nenhum polímero diferente de polissorbato 80, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que inclui a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 2 com até duas inserções, substituições ou deleções de aminoácidos simples e compreende uma cadeia leve que inclui a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 com até duas inserções, substituições ou deleções de aminoácidos simples; o anticorpo compreende uma cadeia pesada que inclui a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 2 com até duas substituições de aminoácidos simples e compreende uma cadeia leve que inclui a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 com até duas substituições de aminoácidos simples; o anticorpo compreende uma cadeia pesada que inclui a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 2 e uma cadeia leve que inclui a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 1.

[0005] Também é descrita uma composição farmacêutica que inclui: um anticorpo incluindo uma cadeia pesada que inclui a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 24 com até 5 inserções, substituições ou deleções de aminoácidos simples e uma cadeia leve que inclui a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 19 com até 5 inserções, substituições ou deleções de aminoácidos simples a 10 ou 30 mg/ml, succinato de sódio 20 a 30 mM, cloreto de sódio 20 a 30 mM, trealose 89 a 92 mg/ml e Polissorbato 800,02 a 0,005% peso/volume, tamponado em pH 6,5.

[0006] Em vários casos, a composição: inclui succinato de sódio 25 mM; cloreto de sódio 25 mM; trealose 90 a 91 mg/ml; inclui trealose 90,5 mg/ml; Polissorbato 80 0,01% peso/volume; inclui succinato de sódio 25 mM, cloreto de sódio 25 mM, trealose 90,5 mg/ml e polissorbato 80 0,01%; a composição não contém quaisquer excipientes adicionais; o

anticorpo compreende uma cadeia pesada que inclui a sequência de aminoácidos de SEQ ID N<sup>o</sup>: 2 com até duas inserções, substituições ou deleções de aminoácidos simples e uma cadeia leve que inclui a sequência de aminoácidos de SEQ ID N<sup>o</sup>: 1 com até duas inserções, substituições ou deleções de aminoácidos simples; o anticorpo compreende uma cadeia pesada que inclui a sequência de aminoácidos de SEQ ID N<sup>o</sup>: 2 com até duas substituições de aminoácidos simples e uma cadeia leve que inclui a sequência de aminoácidos de SEQ ID N<sup>o</sup>: 19 com até duas substituições de aminoácidos simples; o anticorpo compreende uma cadeia pesada que inclui a sequência de aminoácidos de SEQ ID N<sup>o</sup>: 2 e uma cadeia leve que inclui a sequência de aminoácidos de SEQ ID N<sup>o</sup>: 1.

[0007] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado como comumente entendido por alguém versado na técnica à qual esta invenção pertence. Os métodos e materiais são descritos neste documento para uso na presente invenção; outros métodos e materiais adequados conhecidos na técnica também podem ser usados. Os materiais, métodos e exemplos são apenas ilustrativos e não pretendem ser limitantes. Todas as publicações, pedidos de patentes, patentes, sequências, entradas de banco de dados e outras referências no presente documento mencionadas são incorporadas por referência em sua totalidade. Em caso de conflito, a presente especificação, incluindo definições, prevalecerá.

[0008] Outras características e vantagens da invenção serão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada e Figuras, e das reivindicações.

### **Descrição das Figuras**

[0009] A Figura 1 mostra os dados para as transições térmicas medidas por DSC para as formulações na Tabela 1.

[0010] A Figura 2 mostra os dados de pureza de tamanho, conforme medido por SEC, em condições aceleradas para as formulações na Tabela 1.

[0011] A Figura 3 mostra os dados para a heterogeneidade de carga medida por cIEF em condições aceleradas para as formulações na Tabela 1.

[0012] A Figura 4 mostra os dados de pureza conforme medido por CE-SDS Caliper (Não Reduzido) em condições aceleradas para as formulações na Tabela 1.

[0013] A Figura 5 mostra os dados de pureza conforme medido por CE-SDS Caliper (Reduzido) em condições aceleradas para as formulações na Tabela 1.

[0014] A Figura 6 mostra os dados de pureza de tamanho, conforme medido por SEC em condições aceleradas para formulações na Tabela 2.

[0015] A Figura 7 mostra os dados para a heterogeneidade de carga conforme medido por cIEF em condições aceleradas para as formulações na Tabela 2.

[0016] A Figura 8 mostra os dados para a distribuição de tamanho conforme medido por espalhamento dinâmico de luz (DLS) para as formulações na Tabela 2.

[0017] A Figura 9 mostra os dados para pureza conforme medido por CE-SDS Caliper (Não Reduzido) em condições aceleradas para as formulações na Tabela 2.

[0018] A Figura 10 mostra os dados para pureza conforme medido por CE-SDS Caliper (Reduzido) em condições aceleradas para as formulações na Tabela 2.

[0019] A Figura 11 mostra os dados para as transições térmicas medidas por DSC para vários pHs de tampão para as formulações na Tabela 2. O início de T<sub>m</sub> mais alto indica melhor estabilidade térmica da

proteína no pH particular. Três transições foram identificadas no estudo de triagem de pH, Tm1, Tm2 e Tm3.

[0020] A Figura 12 mostra uma comparação dos níveis % das espécies principais de anticorpos por cIEF sob estresse de temperatura. Os resultados de estabilidade do anticorpo em condições de armazenamento de longo prazo de 2 a 8°C são mostrados como uma linha sólida, e as condições de armazenamento acelerado em 25°C/60% RH como uma linha pontilhada. O anticorpo a 30 mg/mL para o Lote D é mostrado em vermelho. O anticorpo a 10 mg/mL para o Lote E é mostrado em preto, para o Lote F mostrado em roxo e para o Lote B mostrado em azul. Nota: A linha de especificação verde se aplica a condições de tempo real entre 2 e 8°C apenas.

[0021] A Figura 13 mostra uma comparação dos níveis % das espécies principais de anticorpos por SEC-HPLC sob estresse de temperatura. Os resultados de estabilidade do anticorpo em condições de armazenamento de longo prazo de 2 a 8°C são mostrados como uma linha sólida, e as condições de armazenamento acelerado a 25°C/60% RH como uma linha pontilhada. O anticorpo a 30 mg/mL para o Lote D é mostrado em vermelho. Um anticorpo a 10 mg/mL para o Lote E é mostrado em preto, para o Lote F mostrado em roxo e para o Lote B mostrado em azul. A linha de especificação verde se aplica a condições de tempo real entre 2 e 8°C apenas.

[0022] As Figuras 14A-14D mostram dados para a concentração de proteína de 10 mg/mL de desenvolvimento DP Lote E por 30 meses, Lote F por 24 meses, GMP Lote A por 24 meses, GMP Lote B por 18 meses (A) em condição de armazenamento de longo prazo de 2 a 8°C no estudo de estabilidade e o gráfico do estudo de regressão para todos os lotes de 10 mg/mL DP (B); concentração de 30 mg/mL de desenvolvimento DP Lote D por 12 meses e GMP Lote C por 3 meses na condição de armazenamento de longo prazo de 2 a 8° no estudo de

estabilidade (C) e o gráfico de estudo de regressão para DP Lote D (D). USL: limite de especificação superior; LSL: limite de especificação inferior.

[0023] As Figuras 15A-15D mostram pH de 10 mg/mL de desenvolvimento DP Lote E por 30 meses, Lote F por 24 meses, GMP Lote A por 24 meses, Lote B por 18 meses (A) na condição de armazenamento de longo prazo de 2 a 8°C em gráfico estudo de estabilidade e gráfico de estudo de regressão para todos os lotes de DP de 10 mg/mL (B); pH de desenvolvimento DP Lote D por 12 meses e GMP Lote C por 3 meses na condição de armazenamento de longo prazo de 2 a 8°C no estudo de estabilidade (C) e no gráfico de estudo de regressão para DP Lote D (D). USL: limite de especificação superior; LSL: limite de especificação inferior.

[0024] As Figuras 16A-16D mostram dados para pureza de tamanho de desenvolvimento DP de 10 mg/mL Lote E por 30 meses, Lote F por 24 meses, Lote GMP A por 24 meses, Lote B por 18 meses (A) na condição de armazenamento de longo prazo de 2 a 8°C no estudo de estabilidade e no gráfico do estudo de regressão para todos os lotes de 10 mg/mL DP (B); Pureza de tamanho por SEC de desenvolvimento DP Lote D por 12 meses e GMP Lote C por 3 meses na condição de armazenamento de longo prazo de 2 a 8°C no estudo de estabilidade (C) e o gráfico de estudo de regressão para DP Lote D (D). LSL: limite de especificação inferior.

[0025] As Figuras 17A-17D mostram dados de pureza por CE-SDS reduzido de 10 mg/mL de desenvolvimento DP Lote E por 30 meses, Lote F por 24 meses, GMP Lote A por 24 meses, Lote B por 18 meses (A) em condição de armazenamento de longo prazo de 2 a 8°C no estudo de estabilidade e o gráfico do estudo de regressão para todos os lotes de DP de 10 mg/mL (B); Pureza HC + LC por CE-SDS reduzido de desenvolvimento DP Lote D por 12 meses e GMP Lote C por 3 meses

na condição de armazenamento de longo prazo de 2 a 8°C no estudo de estabilidade (C) e o gráfico de estudo de regressão para DP Lote D (D) LSL: limite de especificação inferior.

[0026] As Figuras 18A-18D mostram dados de pureza de tamanho por CE-SDS não reduzido de desenvolvimento DP de 10 mg/mL Lote E por 30 meses, Lote F por 24 meses, GMP Lote A por 24 meses, Lote B por 18 meses (A) em condição de armazenamento de longo prazo de 2 a 8°C no estudo de estabilidade e o gráfico do estudo de regressão para todos os lotes de 10 mg/mL DP (B); pureza de tamanho por CE-SDS não reduzido de desenvolvimento DP Lote D por 12 meses e GMP Lote C por 3 meses na condição de armazenamento de longo prazo de 2 a 8°C no estudo de estabilidade (C) e o gráfico de estudo de regressão para DP Lote D (D) LSL: limite de especificação inferior.

[0027] As Figuras 19A-D mostram os dados para o nível de pico A por CE-SDS não reduzido de 10 mg/mL de desenvolvimento DP Lote E por 30 meses, Lote F por 24 meses, GMP Lote A por 24 meses, Lote B por 18 meses (A) na condição de armazenamento de longo prazo de 2 a 8°C no estudo de estabilidade e no gráfico do estudo de regressão para todos os lotes de 10 mg/mL DP (B); Nível de pico A por CE-SDS não reduzido de desenvolvimento DP Lote D por 12 meses e GMP Lote C por 3 meses na condição de armazenamento de longo prazo de 2 a 8°C no estudo de estabilidade (C) e o gráfico de estudo de regressão para DP Lote D (D). USL: limite superior de especificação.

[0028] As Figuras 20A-D mostram os dados para o pico principal de cIEF de 10 mg/mL de desenvolvimento DP Lote E por 30 meses, Lote F por 24 meses, GMP Lote A por 24 meses, Lote B por 18 meses (A) na condição de armazenamento de longo prazo de 2 a 8°C no estudo de estabilidade e o gráfico do estudo de regressão para todos os lotes de 10 mg/mL DP (B); Pico principal do cIEF de desenvolvimento DP Lote D até 12 meses e GMP Lote C até 3 meses na condição de

armazenamento de longo prazo de 2 a 8°C no estudo de estabilidade (C) e o gráfico de estudo de regressão para DP Lote D (D). LSL: limite de especificação inferior.

[0029] As Figuras 21A-21D mostram dados para o pico ácido a partir de cIEF de 10 mg/mL de desenvolvimento DP Lote E por 30 meses, Lote F por 24 meses, GMP Lote A por 24 meses, Lote B por 18 meses (A) em condição de armazenamento de longo prazo de 2 a 8°C no estudo de estabilidade e o gráfico do estudo de regressão para todos os lotes de 10 mg/mL DP (B); Pico ácido a partir de cIEF de desenvolvimento DP Lote D por 12 meses e GMP Lote C por 3 meses na condição de armazenamento de longo prazo de 2 a 8°C no estudo de estabilidade (C) e o gráfico de estudo de regressão para DP Lote D (D). USL: limite de especificação superior.

[0030] As Figuras 22A-22D mostram dados para o pico básico a partir de cIEF de desenvolvimento de DP de 10 mg/mL Lote E por 30 meses, Lote F por 24 meses, Lote GMP A por 24 meses, Lote B por 18 meses (A) em condição de armazenamento de longo prazo de 2 a 8°C no estudo de estabilidade e o gráfico de estudo de regressão para todos os lotes de 10 mg/mL DP (B); Pico básico a partir de cIEF de desenvolvimento DP Lote D por 12 meses e GMP Lote C por 3 meses na condição de armazenamento de longo prazo de 2 a 8°C no estudo de estabilidade (C) e no gráfico de estudo de regressão (D). USL: limite de especificação superior.

[0031] As Figuras 23A-23D mostram os dados para a potência de 10 mg/mL DP GMP Lote A por 24 meses, Lote B por 18 meses (A) na condição de armazenamento de longo prazo de 2 a 8°C no estudo de estabilidade e o gráfico do estudo de regressão para ambos os lotes de 10 mg/mL DP (B); Potência de desenvolvimento DP Lote D por 12 meses e GMP Lote C por 3 meses na condição de armazenamento de longo prazo de 2 a 8°C no estudo de estabilidade (C) e no gráfico de

estudo de regressão (D). USL: limite de especificação superior; LSL: limite de especificação inferior.

### **Descrição Detalhada**

[0032] A presente descrição apresenta composições compreendendo anticorpos para o receptor de Fc neonatal humano (FcRn). Estas composições são úteis, por exemplo, para promover a eliminação de autoanticorpos em um sujeito, para suprimir a apresentação do antígeno em um sujeito, para bloquear uma resposta imune, por exemplo, bloquear uma ativação baseada em complexo imune da resposta imune em um sujeito, ou para tratar doenças imunológicas (por exemplo, doenças autoimunes) em um sujeito.

[0033] Após estudos iniciais, formulações selecionadas foram preparadas com diferentes concentrações de cloreto de sódio, trealose e tensoativo polissorbato (PS) 80, agentes tampão e tamponados em diferentes pH (pH 5 a 8). Assim, as composições incluem um estabilizador de osmólito iônico (cloreto de sódio) e estabilizador de osmólito não iônico (trealose). A estabilidade das formulações mencionadas acima foi avaliada ao longo do tempo por aparência, pH, concentração de proteína, pureza de tamanho, distribuição de carga e estabilidade térmica. Esses parâmetros de estabilidade foram medidos por técnicas analíticas, incluindo pH, UV-Vis, cromatografia por exclusão de tamanho, cromatografia de troca iônica, CE-SDS e calorimetria diferencial de varredura.

[0034] Duas formulações exibiram estabilidade melhorada conforme avaliado através das métricas mencionadas acima e a estabilidade foi mantida ao longo do tempo: (1) fosfato de sódio 25 mM, cloreto de sódio 25 mM, trealose 90,5 mg ml<sup>-1</sup>, polissorbato (PS) 80 0,01%, e anticorpo (tendo cadeia pesada compreendendo a sequência SEQ ID N°: 2 e uma cadeia leve compreendendo SEQ ID N°: 1) 10 ou 30 mg ml<sup>-1</sup> tamponado a pH 6,5; e (2) succinato de sódio 25 mM, cloreto

de sódio 25 mM, trealose 90,5 mg ml<sup>-1</sup>, polissorbato (PS) 80 0,01%, e anticorpo (tendo cadeia pesada compreendendo a sequência SEQ ID N<sup>o</sup>: 2 e uma cadeia leve compreendendo SEQ ID N<sup>o</sup>: 1) 10 ou 30 mg ml<sup>-1</sup> tamponado a pH 6,6. A estabilidade das duas formulações mencionadas acima foi posteriormente testada na presença de estresses mecânicos, térmicos e químicos selecionados. Ambas as formulações não exibiram nenhuma deterioração significativa na estabilidade avaliada através das múltiplas métricas mencionadas acima ao longo do tempo. Notavelmente, a estabilidade foi mantida por mais de 30 meses para a formulação (1) fosfato de sódio 25 mM, cloreto de sódio 25 mM, trealose 90,5 mg ml<sup>-1</sup>, polissorbato (PS) 80 0,01%, e anticorpo 10 ou 30 mg ml<sup>-1</sup> tamponado em pH 6,5. Também foi testada uma formulação que inclui fosfato de sódio 25 mM, cloreto de sódio 25 mM, trealose 90,5 mg ml<sup>-1</sup>, e anticorpo (tendo uma cadeia pesada compreendendo a sequência SEQ ID N<sup>o</sup>: 2 e uma cadeia leve compreendendo a SEQ ID N<sup>o</sup>: 1) tamponada em pH 6,5 com diferentes quantidades de polissorbato 80.

#### Anticorpos Anti-FcRn

[0035] Os anticorpos que podem ser formulados conforme descrito neste documento incluem um anticorpo tendo a sequência de cadeia leve de SEQ ID N<sup>o</sup>: 1 e a sequência de cadeia pesada de SEQ ID N<sup>o</sup>: 2 (também descrita como M281; composições contendo este anticorpo são frequentemente descritas como M281). As variantes deste anticorpo também podem ser formuladas como no presente documento descrito. Tais variantes incluem: um anticorpo tendo uma sequência de cadeia leve de uma variante de SEQ ID N<sup>o</sup>: 1 tendo uma a 5 substituições ou deleções de aminoácidos simples (e preferencialmente compreendendo as sequências de CDR de SEQ ID N<sup>os</sup>: 3-5) e uma sequência de cadeia pesada de uma variante de SEQ ID N<sup>o</sup>: 2 tendo uma a 5 substituições ou deleções de aminoácidos simples (e de

preferência compreendendo as sequências de CDR de SEQ ID Nos: 6-8). Os anticorpos que são compostos por uma variante de SEQ ID N°: 1 e uma variante de SEQ ID N°: 2, preferencialmente retêm as sequências de CDR: TGTGSDVGSYNLVS (CDR1 de cadeia leve; SEQ ID N°: 3); GDSERPS (CDR2 de cadeia leve; SEQ ID N°: 4); SSYAGSGIYV (CDR3 de cadeia leve; SEQ ID N°: 5); TYAMG (CDR1 de cadeia pesada; SEQ ID N°: 6); SIGASGSQTRYADS (CDR2 de cadeia pesada; SEQ ID N°: 7); e LAIGDSY (CDR3 de cadeia pesada; SEQ ID N°: 8).

[0036] Em alguns casos, a cadeia leve tem uma sequência tendo pelo menos 90%, 95% ou 98% de identidade com:

[0037] QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTGSDVGSYNLVSQWYQ  
 QHPGKAPKLMYIGDSERPSGVSNRFSKSGNTASLTISGLQAEDEA  
 DYYCSSYAGSGIYVFGTGTKVTVLGQPKAAPSVTLPSSSEELQANK  
 ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASS  
 YLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID N°: 1).

[0038] Em alguns casos, a cadeia pesada tem uma sequência tendo pelo menos 90%, 95% ou 98% de identidade com:

[0039] EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMGWVR  
 QAPGKGLEWVSSIGASGSQTRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN  
 SLRAEDTAVYYCARLAIGDSYWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSS  
 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG  
 LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT  
 CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE  
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT  
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD  
 KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID N°: 2).

#### Vetores, Células Hospedeiras e Produção de Anticorpos

[0040] Os anticorpos anti-FcRn podem ser produzidos a partir de uma célula hospedeira. Uma célula hospedeira refere-se a um veículo

que inclui os componentes celulares necessários, por exemplo, organelas, necessárias para expressar os polipeptídeos e construtos no presente documento descritos a partir de seus ácidos nucleicos correspondentes. Os ácidos nucleicos podem ser incluídos em vetores de ácido nucleico que podem ser introduzidos na célula hospedeira por técnicas convencionais conhecidas (por exemplo, transformação, transfecção, eletroporação, precipitação com fosfato de cálcio, microinjeção direta, infecção, etc.). A escolha de vetores de ácido nucleico depende, em parte, das células hospedeiras a serem utilizadas. Geralmente, as células hospedeiras preferenciais são de origem procariótica (por exemplo, bacteriana) ou eucariótica (por exemplo, mamífero).

#### Construção de Vetor de Ácido Nucleico e Células Hospedeiras

[0041] Uma sequência de ácido nucleico codificando a sequência de aminoácidos de um anticorpo anti-FcRn pode ser preparada por uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Estes métodos incluem, mas não estão limitados a mutagênese mediada por oligonucleotídeo (ou sítio-dirigida) e mutagênese por PCR. Uma molécula de ácido nucleico codificando um anticorpo anti-FcRn pode ser obtida usando técnicas padrão, por exemplo, síntese de genes. Alternativamente, uma molécula de ácido nucleico codificando um anticorpo anti-FcRn de ocorrência natural pode ser mutada para conter substituições de aminoácidos específicas usando técnicas padrão, por exemplo, mutagênese QuikChange™. As moléculas de ácido nucleico podem ser sintetizadas usando um sintetizador de nucleotídeos ou técnicas de PCR.

[0042] As sequências de ácido nucleico codificando um anticorpo anti-FcRn podem ser inseridas em um vetor capaz de replicar e expressar as moléculas de ácido nucleico em células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas. Muitos vetores estão disponíveis na

técnica e podem ser usados. Cada vetor pode conter vários componentes que podem ser ajustados e otimizados para compatibilidade com a célula hospedeira particular. Por exemplo, os componentes do vetor podem incluir, mas não estão limitados a uma origem de replicação, um gene marcador de seleção, um promotor, um sítio de ligação ao ribossomo, uma sequência sinal, a sequência de ácido nucleico codificando a proteína de interesse, e uma sequência de terminação de transcrição.

[0043] As células de mamíferos podem ser usadas como células hospedeiras. Exemplos de tipos de células de mamíferos incluem, mas não estão limitados a células de rim embrionário humano (HEK) (por exemplo, HEK293, HEK 293F), células de ovário de hamster chinês (CHO), células HeLa, COS, PC3, Vero, MC3T3, NS0, Sp2/0, VERY, BHK, MDCK, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20, T47D, NS0 (uma linhagem celular de mieloma murino que não produz endogenamente nenhuma cadeia de imunoglobulina), células CRL7030 e HsS78Bst. Por outro lado, células de *E. coli* podem ser usadas como células hospedeiras. Exemplos de cepas de *E. coli* incluem, mas não estão limitados a células 294 de *E. coli* (ATCC® 31.446),  $\lambda$  1776 de *E. coli* (ATCC® 31.537, BL21 de *E. coli* (DE3) (ATCC® BAA-1025), e RV308 de *E. coli* (ATCC® 31,608). Diferentes células hospedeiras têm características e mecanismos específicos para o processamento pós-tradução e modificação de produtos proteicos. Linhagens celulares ou sistemas hospedeiros apropriados podem ser escolhidos para garantir a modificação e processamento corretos do anticorpo anti-FcRn expresso. Os vetores de expressão descritos acima podem ser introduzidos em células hospedeiras apropriadas usando técnicas convencionais, por exemplo, transformação, transfecção, eletroporação, precipitação com fosfato de cálcio e microinjeção direta. Uma vez que os vetores são introduzidos nas células hospedeiras para

a produção de proteínas, as células hospedeiras são cultivadas em meio nutriente convencional modificado conforme apropriado para induzir promotores, selecionar transformantes ou amplificar os genes que codificam as sequências desejadas. Os métodos para a expressão de proteínas terapêuticas são conhecidos na técnica, ver, por exemplo, Paulina Balbas, Argelia Lorence (eds.) *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Humana Press; 2ª ed. 2004 (20 de julho de 2004) e Vladimir Voynov e Justin A. Caravella (eds.) *Therapeutic Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)* Humana Press; 2ª ed. 2012 (28 de junho de 2012).

[0044] Produção, Recuperação e Purificação de Proteínas

[0045] As células hospedeiras utilizadas para produzir um anticorpo anti-FcRn podem ser cultivadas em meios conhecidos na técnica e adequados para a cultura das células hospedeiras selecionadas. Exemplos de meios adequados para células hospedeiras de mamíferos incluem meio essencial mínimo (MEM), meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), meio de expressão Expi293™, DMEM com soro fetal bovino suplementado (FBS), e RPMI-1640. Exemplos de meios adequados para células hospedeiras bacterianas incluem caldo Luria (LB) mais os suplementos necessários, tal como um agente de seleção, por exemplo, ampicilina. As células hospedeiras são cultivadas em temperaturas adequadas, tal como de cerca de 20°C a cerca de 39°C, por exemplo, de 25°C a cerca de 37°C, de preferência 37°C, e níveis de CO<sub>2</sub>, tal como de 5 a 10% (de preferência 8%). O pH do meio é geralmente de cerca de 6,8 a 7,4, por exemplo, 7,0, dependendo principalmente do organismo hospedeiro. Se um promotor induzível é usado no vetor de expressão, a expressão da proteína é induzida sob condições adequadas para a ativação do promotor.

[0046] A recuperação de proteínas envolve tipicamente a ruptura da célula hospedeira, geralmente por meios tais como choque osmótico,

sonicação ou lise. Uma vez que as células são rompidas, os detritos celulares podem ser removidos por centrifugação ou filtração. As proteínas podem ser posteriormente purificadas. Um anticorpo anti-FcRn pode ser purificado por qualquer método conhecido na técnica de purificação de proteínas, por exemplo, por afinidade com proteína A, outra cromatografia (por exemplo, troca iônica, afinidade e cromatografia em coluna por exclusão de tamanho), centrifugação, solubilidade diferencial, ou por qualquer outra técnica padrão para a purificação de proteínas. (ver Process Scale Purification of Antibodies, Uwe Gottschalk (ed.) John Wiley & Sons, Inc., 2009). Em alguns casos, um anticorpo anti-FcRn pode ser conjugado a sequências marcadoras, tal como um peptídeo para facilitar a purificação. Um exemplo de uma sequência de aminoácidos de marcador é um peptídeo hexa-histidina (marcador His), que se liga a uma coluna de afinidade de agarose funcionalizada com níquel com afinidade micromolar. Outros marcadores peptídicos úteis para purificação incluem, mas não estão limitados a marcador de hemaglutinina "HA", que corresponde a um epítipo derivado da proteína hemaglutinina da influenza.

#### Métodos de Tratamento e Indicações

[0047] O bloqueio de FcRn humano pelas composições farmacêuticas contendo anticorpos anti-FcRn no presente documento descritos pode ser de benefício terapêutico em doenças que são induzidas por autoanticorpos IgG. A capacidade do bloqueio de FcRn de induzir o catabolismo de IgG geral e a remoção de múltiplas espécies de autoanticorpos, pequenos metabólitos circulantes, ou lipoproteínas, oferece um método para expandir a utilidade e a acessibilidade de uma estratégia de remoção de autoanticorpos para pacientes com patologia de doença autoimune induzida por autoanticorpos. Sem estar limitado a nenhuma teoria, o mecanismo de ação dominante de um anticorpo anti-FcRn pode ser aumentar o catabolismo de autoanticorpos patogênicos

na circulação e diminuir a deposição de autoanticorpos e imunocomplexos nos tecidos afetados.

[0048] As composições farmacêuticas são úteis para promover o catabolismo e a eliminação de anticorpos patogênicos, por exemplo, IgG e autoanticorpos IgG em um sujeito, para reduzir a resposta imune, por exemplo, para bloquear a ativação baseada em complexo imune da resposta imune em um sujeito, e para tratar condições ou doenças imunológicas em um sujeito. Em particular, as composições farmacêuticas são úteis para reduzir ou tratar uma ativação baseada em complexo imune de uma resposta imune aguda ou crônica. A resposta imune aguda pode ser ativada por uma condição médica selecionada a partir do grupo que consiste de pênfigo vulgar, nefrite lúpica, miastenia gravis, síndrome de Guillain-Barré, rejeição mediada por anticorpos, síndrome de anticorpo antifosfolípídico catastrófica, vasculite mediada por imunocomplexos, glomerulite, uma canalopatia, neuromielite óptica, perda auditiva autoimune, púrpura trombocitopênica idiopática (ITP), anemia hemolítica autoimune (AIHA), neutropenia imune, cardiomiopatia dilatada, e doença do soro. A resposta imune crônica pode ser ativada por uma condição médica selecionada a partir do grupo que consiste de polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica (CIDP), lúpus sistêmico, uma forma crônica de um distúrbio indicado para tratamento agudo, artropatias reativas, cirrose biliar primária, colite ulcerativa e vasculite associada ao anticorpo antineutrófilo citoplasmático (ANCA).

[0049] Em alguns casos, as composições farmacêuticas são úteis para reduzir ou tratar uma resposta imune ativada por uma doença autoimune. A doença autoimune pode ser selecionada a partir do grupo que consiste de alopecia areata, espondilite anquilosante, síndrome antifosfolípídica, doença de Addison, anemia hemolítica, hepatite autoimune, hepatite, doença de Behcets, penfigoide bolhoso,

cardiomiopatia, dermatite de sprue celíaco, síndrome da fadiga crônica - disfunção imune, polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, esclerodermia limitada (síndrome de CREST), doença por aglutininas a frio, doença de Crohn, dermatomiosite, lúpus discoide, crioglobulinemia mista essencial, fibromialgia, fibromiosite, doença de Graves, tireoidite de Hashimoto, hipotireoidismo, doença inflamatória intestinal, síndrome linfoproliferativa autoimune, fibrose pulmonar idiopática, nefropatia por IgA, diabetes insulino-dependente, artrite juvenil, líquen plano, lúpus, doença de Ménière, doença mista do tecido conjuntivo, esclerose múltipla, anemia perniciosa, poliarterite nodosa, policondrite poliglandular, policondrite, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiosite, agamaglobulinemia primária, cirrose biliar primária, psoríase, fenômeno de Raynaud, síndrome de Reiter, febre reumática, artrite reumatoide, sarcoidose, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome da pessoa rígida, arterite de Takayasu, arterite temporal, colite ulcerativa, uveíte, vitiligo, vasculite associada a anticorpo citoplasmático antineutrófilos (ANCA), miastenia gravis, neuromielite óptica ou granulomatose de Wegener.

[0050] Em alguns casos, as composições farmacêuticas são úteis para diminuir o risco ou diminuir o risco de desenvolver anemia no feto. Em alguns casos, as composições farmacêuticas são úteis para diminuir ou evitar a necessidade de IUT (transfusão intrauterina). Em alguns casos, as composições farmacêuticas e métodos são úteis para diminuir ou evitar a necessidade de PP + IVIg pré-natal, transfusão pós-natal, IVIg e/ou fototerapia.

[0051] Em alguns casos, as composições farmacêuticas são úteis para reduzir ou tratar uma resposta imune em um feto ou recém-nascido. Em alguns casos, as composições farmacêuticas e métodos são úteis para reduzir ou tratar uma resposta imune em um feto ou recém-nascido ativada por uma doença autoimune na mãe grávida.

[0052] Em particular, as composições farmacêuticas são úteis para reduzir ou tratar uma resposta imune ativada por lúpus eritematoso sistêmico, síndrome antifosfolipídica, pênfigo vulgar/penfigoide bolhoso, vasculite associada a anticorpos citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA), miastenia grave ou neuromielite óptica. Em alguns casos, as composições farmacêuticas são úteis para reduzir ou tratar uma resposta imune em um feto ou recém-nascido. Em alguns casos, as composições farmacêuticas e métodos são úteis para reduzir ou tratar uma resposta imune ativada por lúpus eritematoso sistêmico, síndrome antifosfolipídica, pênfigo vulgar/penfigoide bolhoso, vasculite associada a anticorpos citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA), miastenia grave ou neuromielite óptica na mãe grávida.

[0053] As composições farmacêuticas são úteis em métodos para diminuir o transporte de anticorpos patogênicos (por exemplo, transporte de anticorpos IgG maternos patogênicos) através da placenta de uma gestante, aumentar o catabolismo de anticorpos patogênicos em uma gestante, e tratar um aumento de doença viral mediado por anticorpos em um feto ou recém-nascido através da administração a uma gestante de um anticorpo isolado que se liga a FcRn humano. Doenças e distúrbios que podem se beneficiar da inibição de FcRn pelas composições farmacêuticas no presente documento descritas incluem doenças e distúrbios em um feto e/ou recém-nascido que são causados pela transferência de anticorpos patogênicos maternos (por exemplo, anticorpos IgG patogênicos maternos) através da placenta de uma gestante para o feto e/ou recém-nascido.

[0054] Em alguns casos, as doenças e distúrbios que podem se beneficiar do tratamento com as composições farmacêuticas no presente documento descritas são distúrbios aloimunes e/ou autoimunes fetais e neonatais. Os distúrbios aloimunes fetais e neonatais são distúrbios em um feto e/ou recém-nascido que são

causados por anticorpos patogênicos na gestante. Os anticorpos patogênicos na gestante podem atacar os antígenos do feto (por exemplo, antígenos que o feto herdou de seu pai), fazendo com que o feto ou o recém-nascido tenham um distúrbio aloimune e/ou autoimune fetal e neonatal.

[0055] Exemplos de distúrbios aloimunes e/ou autoimunes fetais e neonatais que podem ser tratados incluem, mas não estão limitados a trombocitopenia aloimune fetal e neonatal (FNAIT), doença hemolítica do feto e recém-nascido (HDFN), pan-trombocitopenia aloimune, bloqueio congênito do coração, artrogripose fetal, miastenia grave neonatal, anemia hemolítica autoimune neonatal, síndrome antifosfolipídica neonatal, polimiosite neonatal, dermatomiosite, lúpus neonatal, esclerodermia neonatal, doença de Behçet, doença de Graves neonatal, doença de Kawasaki neonatal, doença autoimune da tireoide neonatal e diabetes mellitus tipo I neonatal.

[0056] Em alguns casos, as doenças e distúrbios que podem se beneficiar do tratamento com as composições farmacêuticas no presente documento descritas são doenças virais em que os anticorpos facilitam a entrada viral nas células hospedeiras, levando a uma melhora da infecciosidade nas células, por exemplo, melhora da doença viral mediada por anticorpos. Em alguns casos, um anticorpo pode se ligar a uma proteína de superfície viral e o complexo anticorpo/vírus pode se ligar a um FcRn em uma superfície celular por meio da interação entre o anticorpo e o receptor. Subsequentemente, o complexo anticorpo/vírus pode ser internalizado na célula. Por exemplo, um vírus pode ganhar entrada nas células e/ou tecidos de um feto através da formação de um complexo com um anticorpo IgG materno. Um anticorpo IgG materno pode se ligar a uma proteína de superfície viral e o complexo IgG/vírus pode se ligar a um FcRn nos sincitiotrofoblastos da placenta, que então transfere o complexo para o feto.

[0057] Em alguns casos, as composições farmacêuticas no presente documento descritas podem ser usadas para tratar uma melhora da doença viral mediado por anticorpos. Em alguns casos, as doenças virais que são melhoradas por anticorpos patogênicos (por exemplo, anticorpos IgG patogênicos) incluem, mas não estão limitadas a, doenças virais causadas por uma infecção por vírus alfa, infecção por flavivírus, infecção por vírus Zika, infecção por vírus Chikungunya, infecção por vírus Ross River, infecção por coronavírus com síndrome respiratória aguda grave, síndrome respiratória do Oriente Médio, infecção por influenza aviária, infecção por vírus influenza, infecção por vírus sincicial respiratório humano, infecção pelo vírus Ebola, infecção por vírus da febre amarela, infecção por vírus da dengue, infecção por vírus da imunodeficiência humana, infecção por vírus sincicial respiratório, infecção por hantavírus, infecção por vírus Getah, infecção por vírus Sindbis, infecção por vírus Bunyamwera, infecção por vírus do Nilo Ocidental, infecção por vírus da encefalite japonesa B, infecção por vírus da varíola do coelho, infecção por vírus que aumenta a lactato desidrogenase, infecção por reovírus, infecção por vírus da raiva, infecção por vírus da febre aftosa, infecção pelo vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína, infecção por vírus da febre hemorrágica símia, infecção por vírus da anemia infecciosa equina, infecção por vírus da artrite caprina, infecção por vírus da peste suína africana, infecção por lentivírus, infecção por papovavírus BK, infecção por vírus da encefalite Murray Valley, infecção por enterovírus, infecção por citomegalovírus, infecção por pneumovírus, infecção por morbilivírus e infecção por vírus do sarampo.

[0058] O bloqueio de FcRn humano por anticorpos anti-FcRn pode ser um benefício terapêutico em doenças que são desencadeadas por anticorpos patogênicos (por exemplo, anticorpos IgG patogênicos). A capacidade do bloqueio de FcRn de induzir o catabolismo geral de

anticorpos patogênicos e a remoção de várias espécies de anticorpos patogênicos sem perturbar a albumina sérica, pequenos metabólitos circulantes ou lipoproteínas oferece um método para expandir a utilidade e a acessibilidade de uma estratégia de remoção de anticorpos patogênicos para pacientes com patologia de doença autoimune desencadeada por anticorpos patogênicos. Embora não seja limitado pela teoria, o mecanismo de ação dominante de um anticorpo anti-FcRn pode ser aumentar o catabolismo de anticorpos patogênicos na circulação e diminuir a deposição de anticorpos patogênicos e de imunocomplexos nos tecidos afetados.

[0059] As composições farmacêuticas no presente documento descritas podem ser administradas a uma gestante que tem ou está em risco de ter uma condição médica que ativa uma resposta imune na gestante. Em alguns casos, a gestante pode ter tido, no passado, uma condição médica que ativou uma resposta imune na gestante. Em alguns casos, a gestante tem um histórico de ter tido um feto ou recém-nascido precedente que tinha um distúrbio aloimune e/ou autoimune fetal e neonatal. Em alguns casos, os anticorpos anti-FcRn no presente documento descritos podem ser administrados a uma gestante se um anticorpo patogênico associado a uma doença imune for detectado em uma amostra biológica (por exemplo, uma amostra de sangue ou urina) obtida a partir da gestante. Em alguns casos, o anticorpo patogênico detectado na amostra biológica da gestante é conhecido por se ligar a um antígeno do feto na gestante (por exemplo, um antígeno que o feto herdou de seu pai).

[0060] Em alguns casos, as composições farmacêuticas podem ser administradas a um sujeito que está planejando engravidar e que tem ou está em risco de ter uma condição médica que ativa uma resposta imune na gestante, e/ou que teve, no passado, uma condição médica que ativou uma resposta imune na gestante. Em alguns casos, um

sujeito está planejando engravidar e tem um histórico de ter tido um feto ou recém-nascido precedente que tinha uma doença aloimune e/ou autoimune fetal e neonatal. Em alguns casos, os anticorpos anti-FcRn no presente documento descritos podem ser administrados a um sujeito que está planejando engravidar e cuja amostra biológica contém um anticorpo patogênico associado a uma doença imune.

[0061] Em alguns casos, as composições farmacêuticas no presente documento descritas podem ser administradas a um sujeito (por exemplo, uma gestante) para reduzir ou tratar uma ativação baseada em complexo imune de uma resposta imune aguda ou crônica no sujeito. A resposta imune aguda pode ser ativada por uma condição médica (por exemplo, pênfigo vulgar, nefrite lúpica, miastenia grave, síndrome de Guillain-Barré, rejeição mediada por anticorpos, síndrome do anticorpo antifosfolipídico catastrófica, vasculite mediada por imunocomplexos, glomerulite, uma canalopatia, neuromielite óptica, perda auditiva autoimune, púrpura trombocitopênica idiopática, anemia hemolítica autoimune, neutropenia imune, cardiomiopatia dilatada, doença do soro, polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica, lúpus sistêmico, artropatias reativas, cirrose biliar primária, colite ulcerativa, ou vasculite associada a anticorpos citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA)).

[0062] Em alguns casos, a formulação no presente documento descrita pode ser administrada a um sujeito (por exemplo, uma gestante) para reduzir ou tratar uma resposta imune ativada por uma doença autoimune. A doença autoimune pode ser, por exemplo, alopecia areata, espondilite anquilosante, síndrome antifosfolipídica, doença de Addison, anemia hemolítica, anemia hemolítica autoimune a quente (wAIHA), anticorpos anti-fator, trombocitopenia induzida por heparina (HICT), transplante sensibilizado, hepatite autoimune, hepatite, doença de Behçet, penfigoide bolhoso, cardiomiopatia,

dermatite de sprue celíaco, síndrome da fadiga crônica - disfunção imune, polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, esclerodermia limitada (síndrome de CREST), doença por aglutininas a frio, doença de Crohn, lúpus discoide, crioglobulinemia mista essencial, fibromialgia, fibromiosite, doença de Graves, tireoidite de Hashimoto, hipotireoidismo, doença inflamatória intestinal, síndrome linfoproliferativa autoimune, fibrose pulmonar idiopática, nefropatia por IgA, diabetes dependente de insulina, artrite juvenil, líquen plano, doença de Ménière, doença mista do tecido conjuntivo, esclerose múltipla, anemia perniciosa, poliarterite nodosa, policondrite, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiosite, agamaglobulinemia primária, cirrose biliar primária, psoríase, fenômeno de Raynaud, síndrome de Reiter, febre reumática, artrite reumática, sarcoidose, escleroderma, síndrome de Sjögren, síndrome da pessoa rígida, arterite de Takayasu, arterite temporal, colite ulcerosa, uveíte, vitiligo ou granulomatose de Wegener.

### **EXEMPLOS**

[0063] Os seguintes materiais e métodos foram usados nos Exemplos no presente documento apresentados.

#### Materiais

[0064] Os materiais adquiridos a partir de fornecedores comerciais incluem fosfato de sódio monobásico monohidratado (J.T. Baker), fosfato de sódio dibásico anidro (J.T. Baker), ácido succínico (TGI), succinato de sódio (Macron), cloreto de sódio (J.T. Baker), ácido cítrico monohidratado (AppliChem), ácido clorídrico (J.T. Baker), hidróxido de sódio (Macron),  $\alpha$ - $\alpha$ -trealose desidratada de alta pureza (baixa endotoxina) (Pfanstiehl), polissorbato 80-LQ superpurificado (MH) (Croda).

[0065] O anticorpo usado neste documento (compreendendo a cadeia pesada SEQ ID N°: 2 e a cadeia leve SEQ ID N°: 1) foi formatado

como uma cadeia pesada do alótipo IgG1 G1m17, uma cadeia leve totalmente lambda sem o terminal Lys (K446: Numeração EU), e com a mutação Asn297Ala (Numeração EU) que elimina a glicosilação em Asn297.

#### Análise de Aparência

[0066] A aparência de todas as amostras, incluindo clareza, cor e partículas visíveis, foi examinada contra um fundo preto e branco usando uma caixa de luz (Tianda Tianfa, Modelo YB-2).

#### Medição de pH

[0067] O pH da amostra foi medido usando um medidor de pH com um eletrodo Inlab<sup>®</sup>Micro (Mettler Toledo, Model Seven Multi S40). O medidor de pH foi calibrado antes de cada uso com soluções de calibração disponíveis comercialmente.

#### Medição da Concentração de Proteína

[0068] A concentração de proteína foi determinada por leituras de UV 280 nm usando um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). O coeficiente de extinção usado em todos os estudos foi 1,447 AU ml mg<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

#### Método para Medição de Osmolalidade

[0069] A osmolalidade foi medida usando um osmômetro (Advanced Instruments, Advanced Multi-Sample Osmometer; Model Number 2020) sem diluição das amostras. Antes e depois do teste, a precisão do teste do osmômetro foi confirmada com solução de referência de 290 mOsm/kg de controle clínico.

#### Calorimetria Diferencial de Varredura

[0070] A calorimetria diferencial de varredura de células capilares (DSC) foi utilizada para medir a estabilidade térmica de proteínas, detectando a diferença na quantidade de calor necessária para aumentar a temperatura de uma amostra e referência como uma função da temperatura. Especificamente, o DEC mede o ponto médio da

transição térmica ( $T_m$ ), que é um indicador da estabilidade relativa da proteína em solução. Em resumo, as amostras foram diluídas a cerca de  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  com tampão de referência disponível comercialmente. Uma alíquota de  $400 \text{ } \mu\text{l}$  de tampão de referência foi adicionada a cada poço de número ímpar de uma placa de 96 poços, enquanto uma alíquota de  $400 \text{ } \mu\text{l}$  de cada amostra foi adicionada ao poço de número par correspondente. A temperatura de varredura varia de  $10^\circ\text{C}$  a  $100^\circ\text{C}$  com uma taxa de varredura de  $200^\circ\text{C}$  por hora. A análise de dados foi realizada usando o software de análise de dados MicroCal VP-Capillary DSC Automatizado 2.0.

#### Cromatografia por Exclusão de Tamanho

[0071] A cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) foi realizada usando um sistema Agilent 1260 Infinity com a coluna de cromatografia por exclusão de tamanho TSKGel G3000SWXL ( $300 \times 7,8 \text{ mm}$ ,  $5 \text{ } \mu\text{M}$ ) a  $25^\circ\text{C}$ . As amostras foram diluídas a  $10 \text{ mg ml}^{-1}$  com fase móvel antes da análise SEC e a amostra contendo  $100 \text{ } \mu\text{g}$  de proteína foi injetada. Um gradiente isocrático foi aplicado por 20 min a uma taxa de fluxo de  $1 \text{ ml min}^{-1}$ . A fase móvel consistia de tampão fosfato de sódio  $50 \text{ mM}$ , NaCl  $300 \text{ mM}$  em  $\text{pH } 7,0 \pm 0,2$ . Os dados foram coletados por detector de UV com comprimento de onda de detecção definido para  $280 \text{ nm}$  e os dados foram analisados usando o software Waters Empower.

#### Focalização Isoelétrica Capilar

[0072] Focalização isoelétrica capilar (cIEF) foi realizada para separar as proteínas com base em diferenças de carga em um gradiente de pH usando equipamento Protein Simple iCE3 com cartucho cIEF revestido com FC. Para amostras de anticorpo monoclonal (mAb),  $20 \text{ } \mu\text{g}$  de cada amostra foram misturados com  $100 \text{ } \mu\text{L}$  de mistura principal compreendendo marcador de ponto isoelétrico (pI)  $7,55/9,46$ , Servalylt 6-9, Servalylt 9-11, solução de metil celulose. Após a mistura, a amostra foi focalizada por 1 min a  $1500 \text{ V}$  e 8 min a  $3000 \text{ V}$ . O

comprimento de onda de detecção foi ajustado para 280 nm e as distribuições das variantes de carga foram avaliadas em diferentes faixas de pI.

#### Eletroforese Capilar

[0073] A eletroforese capilar (CE-SDS Caliper) foi realizada para separar as proteínas revestidas com dodecil sulfato com base no tamanho através de um polímero de peneiramento usando um instrumento Beckman Coulter PA800 Aprimorado ou PA800 Plus equipado com um detector de arranjo de fotodiodos. Para CE-SDS Caliper medido em condições de redução, as amostras foram diluídas a 4 mg ml<sup>-1</sup> por solução de diluição (PB-CA) e, em seguida, aquecidas na presença de 75 µl de tampão de amostra SDS e 5 µl de 2-mercaptoetanol a 70°C por 10 minutos. Para CE-SDS Caliper medido em condições não redutoras, as amostras foram diluídas a 4 mg ml<sup>-1</sup> por solução de diluição (PB-CA) e, em seguida, aquecidas na presença de 75 µl de tampão de amostra SDS e 5 µl de NEM a 100 mM a 70°C por 10 minutos. As amostras – preparadas em condições redutoras ou não redutoras – foram injetadas no catodo com polaridade reversa usando -5 kV por 20 segundos seguido por separação em -15 kV e o comprimento de onda de detecção foi definido como 220 nm.

#### Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

[0074] DLS é uma técnica que mede o grau em que a luz é espalhada por uma solução em uma determinada temperatura. O grau de espalhamento é proporcional ao tamanho (à sexta potência) e à concentração (linear) da partícula em solução. Esta técnica é usada para monitorar partículas submicrônicas devido ao profundo efeito do tamanho das partículas no espalhamento da luz. O pH mais baixo (5,0) e o pH mais alto (8,0) mostraram aumentos na distribuição de tamanho. Todos os outros pHs não mostraram diferenças óbvias.

Exemplo 1. Estudo de desenvolvimento de formulação líquida para determinar como selecionar os componentes da formulação – espécies tampão, pH, e excipientes – impacto na estabilidade de formulações líquidas compreendendo o anticorpo

[0075] As formulações selecionadas do anticorpo no presente documento descrito (compreendendo a cadeia pesada SEQ ID N<sup>o</sup>: 2 e a cadeia leve SEQ ID N<sup>o</sup>: 1) presente a 30 mg/ml com diferentes concentrações de fosfato de sódio, succinato de sódio, NaCl, Trealose e PS-80 foram preparadas e as propriedades da formulação – por exemplo, aparência, pH, concentração de proteína, osmolalidade, estabilidade térmica, pureza de tamanho, heterogeneidade de carga – foram medidas ao longo do tempo e comparadas.

[0076] As formulações selecionadas conforme detalhadas na Tabela 1 foram preparadas.

Tabela 1 – Componentes e condições tampão para as formulações selecionadas.

Formu- lação	pH	Tampão (25mM)	Modificador de Tonicidade, Estabilizador, Tensoativo	Concentração de anticorpo mg/mL
F1	7,5	Fosfato de sódio	NaCl 25 mM	30
F2	7,5	Fosfato de sódio	NaCl 25 mM + Trealose 90,5 mg/mL	30
F3	7,5	Fosfato de sódio	NaCl 25 mM + Trealose 90,5 mg/mL + PS 80 0,01% peso/volume	30
F4	7,5	Fosfato de sódio	NaCl 150 mM	30
F5	7,5	Fosfato de sódio	NaCl 150 mM + Trealose 90,5 mg/mL	30
F6	7,5	Fosfato de sódio	NaCl 150 mM + Trealose 90,5 mg/mL + PS 80 0,01% peso/volume	30
F7	7,0	Fosfato de sódio	NaCl 25 mM	30
F8	7,0	Fosfato de sódio	NaCl 25 mM + Trealose 90,5 mg/mL	30
F9	7,0	Fosfato de sódio	NaCl 25 mM + Trealose 90,5 mg/mL + PS 80 0,01% peso/volume	30
F10	7,0	Fosfato de sódio	NaCl 150 mM	30
F11	7,0	Fosfato de sódio	NaCl 150 mM + Trealose 90,5 mg/mL	30
F12	7,0	Fosfato de sódio	NaCl 150 mM + Trealose 90,5 mg/mL + PS 80 0,01% peso/volume	30
F13	6,5	Succinato de sódio	NaCl 25 mM	30
F14	6,5	Succinato de sódio	NaCl 25 mM + Trealose 90,5 mg/mL	30
F15	6,5	Succinato de sódio	NaCl 25 mM + Trealose 90,5 mg/mL + PS 80 0,01% peso/volume	30
F16	6,5	Succinato de sódio	NaCl 150 mM	30
F17	6,5	Succinato de sódio	NaCl 150 mM + Trealose 90,5 mg/mL	30
F18	6,5	Succinato de sódio	NaCl 150 mM + Trealose 90,5 mg/mL + PS 80 0,01% peso/volume	30

[0077] As formulações foram monitoradas ao longo do tempo com base na aparência, pH, concentração de proteína, osmolalidade, estabilidade térmica, pureza de tamanho e heterogeneidade de carga. Nenhuma formulação testada exibiu alterações significativas no pH, concentração de proteína ou osmolalidade durante o estudo. Em contraste, os subconjuntos das formulações exibiram diferenças por aparência, estabilidade térmica, pureza de tamanho e heterogeneidade de carga. Especificamente, todas as formulações sem Trealose apresentaram opalescência – uma aparência observada em sistemas altamente dispersos com pouca opacidade – após 14 dias em condições aceleradas (50° C). Todas as outras formulações permaneceram incolores, límpidas e livres de partículas visíveis após 4 semanas de 2 a 8°C e 14 dias em condições aceleradas (50°C). Estes resultados indicam que o componente Trealose confere estabilidade às formulações líquidas compreendendo M281. A estabilidade térmica das diferentes formulações foi determinada por calorimetria diferencial de varredura (Figura 1). Os resultados indicam que o aumento da estabilidade é conferido a formulações contendo concentração inferior de cloreto de sódio ou contendo trealose. A pureza de tamanho das diferentes formulações foi determinada por cromatografia por exclusão de tamanho (Figura 2). Os resultados indicam que as formulações contendo baixa concentração de cloreto de sódio e trealose em pH 6,5 exibem a maior estabilidade de pureza de tamanho ao longo do tempo. A heterogeneidade de carga das diferentes formulações foi determinada por focalização isoelétrica capilar (cIEF) em condições aceleradas (50° C) (Figura 3). Variar a concentração de diferentes estabilizadores – por exemplo, cloreto de sódio, Trealose, PS 80 – não afetou significativamente a heterogeneidade de carga das formulações ao longo do tempo. Em contraste, o pH das formulações tem um efeito significativo, especificamente as formulações em pH 6,5 exibiram uma

melhor manutenção da heterogeneidade de carga após uma e duas semanas em comparação com as formulações em pH 7 ou pH 7,5. A pureza das diferentes formulações foi medida por CE-SDS Caliper em condições de aceleração não reduzida (Figura 4) e em condições de aceleração reduzida (50°C) (Figura 5). Os resultados indicam que o aumento da estabilidade ao longo do tempo é conferido às formulações contendo trealose e tamponadas a pH 6,5 em comparação com pH 7 ou pH 7,5.

[0078] No geral, as formulações com Trealose foram mais estáveis do que aquelas sem Trealose. As formulações com NaCl 25 mM foram mais estáveis do que aquelas contendo NaCl 150 mM. Em conclusão, os resultados desta triagem de formulação indicaram que, dentre as formulações testadas, a formulação com NaCl 25 mM e trealose 90,5 mg/mL exibe a maior estabilidade e a estabilidade é suficientemente mantida ao longo de uma e duas semanas.

[0079] Para determinar como o pH da formulação afeta a estabilidade da formulação, as formulações selecionadas do anticorpo (10 mg/ml) em tampão 25 mM de ácido cítrico e fosfato dibásico foram preparadas em diferentes pH e as propriedades da formulação (por exemplo, aparência, pH, concentração de proteína, osmolalidade, estabilidade térmica, pureza de tamanho e heterogeneidade de carga, etc.) foram medidas e comparadas. As formulações selecionadas conforme detalhadas na Tabela 2 foram preparadas.

**Tabela 2** – Condições tampão para as formulações selecionadas

<b>Formulação</b>	<b>pH</b>	<b>Tampão (25mM)</b>	<b>Anticorpo mg/mL</b>
F19	5,0	Tampão de ácido cítrico & fosfato dibásico	10
F20	5,5	Tampão de ácido cítrico & fosfato dibásico	10
F21	6,0	Tampão de ácido cítrico & fosfato dibásico	10
F22	6,5	Tampão de ácido cítrico & fosfato dibásico	10
F23	7,0	Tampão de ácido cítrico & fosfato dibásico	10
F24	7,5	Tampão de ácido cítrico & fosfato dibásico	10
F25	8,0	Tampão de ácido cítrico & fosfato dibásico	10

[0080] As formulações foram monitoradas ao longo do tempo com base na aparência, pH, concentração de proteína, osmolalidade, estabilidade térmica, pureza de tamanho e heterogeneidade de carga. Nenhuma formulação exibiu alterações significativas na aparência, pH, concentração de proteína ou osmolalidade durante o estudo. Em contraste, subconjuntos das formulações exibiram diferenças em pureza de tamanho, heterogeneidade de carga e estabilidade térmica. A pureza de tamanho das diferentes formulações foi determinada por cromatografia por exclusão de tamanho (Figura 6). As formulações em pH 5, pH 7, pH 7,5 e pH 8 exibiram quantidades reduzidas das moléculas de tamanho alvo (descritas como pico principal ou alvo) em comparação com as formulações em pH 6 ou 6,5. Estes resultados indicam que as formulações em pH 6 e 6,5 exibem pureza de tamanho superior. A heterogeneidade de carga das diferentes formulações foi determinada por focalização isoelétrica capilar (cIEF) em condições aceleradas (50°C) (Figura 7). As formulações em pH 5,5, 6,0 e 6,5 exibiram uma melhor manutenção da heterogeneidade de carga em comparação com as formulações tamponadas nos pHs mais elevados

testados. A distribuição de tamanho das diferentes formulações foi determinada por espalhamento dinâmico de luz (Figura 8). As formulações em pH 5,5 a 7,5 não mostraram alterações significativas na distribuição de tamanho. Em contraste, as formulações em pH 5 e pH 8 mostraram alterações na distribuição de tamanho, indicando que as formulações em pH 5 ou 8 não são estáveis e podem formar produtos de degradação ao longo do tempo. A pureza das diferentes formulações foi medida por CE-SDS Caliper em condições aceleradas não reduzidas (50°C) (Figura 9) e em condições aceleradas reduzidas (50°C) (Figura 10). Os resultados indicam que o aumento da estabilidade é conferido às formulações tamponadas em pH 5, 5,5, 6 ou 6,5 e esta estabilidade é preservada na presença de condições aceleradas redutoras (na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol) ou não redutoras (na presença de N-etilmaleimida). A estabilidade térmica das diferentes formulações foi determinada por calorimetria diferencial de varredura (Figura 11). As formulações tamponadas em pH 5,5, pH 6 e pH 6,5 exibiram maior estabilidade térmica em comparação com aquelas tamponadas em pH 7, pH 7,5 ou pH 8. A maior estabilidade térmica foi conferida às formulações tamponadas em pH 6,5, dado que a Formulação 22 tinha os maiores valores de início de Tm e Tm1.

[0081] Em conclusão, os resultados deste estudo de desenvolvimento de formulação líquida indicam que a estabilidade da formulação foi conferida a formulações líquidas do anticorpo preparado com NaCl 25 mM e trealose 90,5 mg/mL e tamponado em pH 6,5.

Exemplo 2. Estudo de análise de estabilidade para determinar a estabilidade de formulações selecionadas quando expostas a estresses mecânicos, químicos e térmicos.

[0082] Para examinar e comparar a estabilidade de formulações selecionadas na presença de estresses, as formulações selecionadas foram preparadas e expostas a diferentes estresses, incluindo agitação

mecânica, luz visível, luz ultravioleta, alta temperatura, múltiplo congelamento-descongelamento, e agentes oxidantes.

### Resultados

[0083] As formulações selecionadas conforme detalhadas na Tabela 3 foram preparadas.

Tabela 3. Componentes e condições tampão para as formulações selecionadas

<b>Formulação</b>	<b>pH</b>	<b>Tampão (25mM)</b>	<b>Modificador de Tonicidade, Estabilizador, Tensoativo</b>	<b>Anticorpo mg/mL</b>
F26	6,5	Fosfato de sódio	NaCl 25 mM + Trealose 90,5 mg/mL + PS 80 0,01% peso/volume	10
F27	6,5	Succinato de sódio	NaCl 25 mM + Trealose 90,5 mg/mL + PS 80 0,01% peso/volume	10
F28	6,5	Fosfato de sódio	NaCl 25 mM + Trealose 90,5 mg/mL + PS 80 0,01% peso/volume	30
F29	6,5	Succinato de sódio	NaCl 25 mM + Trealose 90,5 mg/mL + PS 80 0,01% peso/volume	30
F30	6,5	Fosfato de sódio	NaCl 25 mM + PS 80 0,01% peso/volume	30
F31	6,5	Succinato de sódio	NaCl 25 mM + PS 80 0,01% peso/volume	30

### Estresse de Agitação

[0084] As formulações foram expostas à agitação mecânica a 250 rpm a 25°C por 5 ou 10 dias. As formulações não exibiram nenhuma alteração significativa na aparência, concentração de proteína, pl, pureza de tamanho ou pureza de carga. Notavelmente, as formulações exibiram proporção similar de pico principal, pico ácido e pico básico no ensaio cIEF, pureza de tamanho medida pelo ensaio Caliper não reduzido e reduzido, e tamanho médio de partícula e Pdl do ensaio DLS em comparação umas com as outras e ao longo do tempo (Tabela 4). No ensaio SEC, a agitação levou a um ligeiro declínio na porcentagem

do pico principal em relação ao teor total e ao aumento do teor de agregados.

**Tabela 4. Componentes da formulação e condições tampão**

Ensaio		N°	ID Amostra	T0	Estudo de Agitação		
					5D	10D	
Aparência		F26	20150401	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis	
		F27	20150402				
Conc. mg/mL		F26	20150401	10,7	10,5	10,5	
		F27	20150402	10,0	9,7	9,7	
pH		F26	20150401	6,42	6,41	6,38	
		F27	20150402	6,55	6,52	6,54	
SEC	Pico principal, %	F26	20150401	98,0	97,9	97,3	
		F27	20150402	98,0	97,7	97,2	
	Pico HMW, %	F26	20150401	2,0	2,1	2,7	
		F27	20150402	2,0	2,2	2,8	
	Pico LMW, %	F26	20150401	ND	ND	ND	
		F27	20150402	ND	ND	0,1	
cIEF	pI	F26	20150401	8,81	NA	8,82	
		F27	20150402	8,82	NA	8,81	
	Pico principal, %	F26	20150401	65,9	NA	64,2	
		F27	20150402	64,6	NA	65,0	
	Pico ácido, %	F26	20150401	31,7	NA	32,6	
		F27	20150402	32,3	NA	32,1	
	Pico básico, %	F26	20150401	2,4	NA	3,2	
		F27	20150402	3,1	NA	2,9	
	Caliper Reduzido	Pureza, %	F26	20150401	97,7	NA	98,3
			F27	20150402	97,5	NA	97,4
Tamanho LC, kDa		F26	20150401	43,9	NA	42,3	
		F27	20150402	43,6	NA	41,8	
Tamanho HC, kDa		F26	20150401	56,8	NA	56,0	
		F27	20150402	58,8	NA	55,1	
Caliper Não Reduzido	Pureza, %	F26	20150401	98,0	NA	98,3	
		F27	20150402	98,0	NA	98,4	
	Tamanho, kDa	F26	20150401	169,5	NA	162,7	
		F27	20150402	170,8	NA	160,9	
DLS	Média Z (d.nm)	F26	20150401	15,5	NA	15,4	
		F27	20150402	15,5	NA	15,4	
	Pdl	F26	20150401	0,10	NA	0,09	
		F27	20150402	0,11	NA	0,11	

Estresse Térmico

[0085] As formulações foram expostas ao estresse térmico a 40°C por 5 ou 10 dias. As formulações não exibiram nenhuma alteração significativa na aparência, concentração de proteína, pl, pureza de tamanho conforme avaliado por SEC ou DLS, ou pureza de carga (Tabela 5). As formulações exibiram declínio no pico principal do ensaio cIEF e um aumento na porcentagem de picos específicos ácidos, no entanto, todas as formulações testadas (Tabela 3) exibiram magnitude similar de alterações.

Tabela 5. Resultados de SEC, cIEF, Caliper Reduzido, Caliper Não Reduzido, Aparência, Concentração de Proteína, pH para a Formulação 26 e 27 após a exposição ao estresse térmico

Ensaio		Nº.	ID Amostra	T0	Estudo de Estabilidade Térmica	
					5D	10D
Aparência		F26	20150401	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis
		F27	20150402			
Conc. mg/mL		F26	20150401	10,7	10,5	10,7
		F27	20150402	10,0	9,7	9,7
pH		F26	20150401	6,42	6,40	6,41
		F27	20150402	6,55	6,51	6,53
SEC	Pico principal, %	F26	20150401	98,0	98,1	97,8
		F27	20150402	98,0	98,0	97,9
	Pico HMW, %	F26	20150401	2,0	1,7	1,9
		F27	20150402	2,0	1,9	1,9
Pico LMW, %	F26	20150401	ND	0,1	0,3	
	F27	20150402	ND	0,1	0,2	
cIEF	pl	F26	20150401	8,81	NA	8,82
		F27	20150402	8,82	NA	8,81
	Pico principal, %	F26	20150401	65,9	NA	54,3
		F27	20150402	64,6	NA	56,3
	Pico ácido, %	F26	20150401	31,7	NA	41,2
		F27	20150402	32,3	NA	39,9
Pico básico, %	F26	20150401	2,4	NA	4,4	
	F27	20150402	3,1	NA	3,8	
Caliper Reduzido	Pureza, %	F26	20150401	97,7	NA	97,3
		F27	20150402	97,5	NA	97,4
	Tamanho LC, kDa	F26	20150401	43,9	NA	42,0
		F27	20150402	43,6	NA	42,8
Tamanho HC, kDa	F26	20150401	56,8	NA	55,5	
	F27	20150402	56,8	NA	56,6	
Caliper Não Reduzido	Pureza, %	F26	20150401	98,0	NA	97,9
		F27	20150402	98,0	NA	98,1
	Tamanho, kDa	F26	20150401	169,5	NA	160,1
		F27	20150402	170,8	NA	163,5
DLS	Média Z (d.nm)	F26	20150401	15,5	NA	15,6
		F27	20150402	15,5	NA	15,3
	Pdl	F26	20150401	0,10	NA	0,10
		F27	20150402	0,11	NA	0,10

Estresse de Luz Visível

[0086] As formulações foram expostas ao estresse de luz visível de 5000 lux a 25°C por 5 ou 10 dias. As formulações não exibiram aparência, concentração de proteína, pH, pl, pureza Caliper não reduzida, tamanho médio de partícula ou Pdl por ensaio DLS (Tabela 6) significativamente diferentes. Foram observadas ligeiras diminuições na pureza da proteína por SEC, cIEF e Caliper reduzido.

Tabela 6. Resultados de SEC, cIEF, Caliper reduzido, Caliper não reduzido, aparência, concentração de proteína, pH para as Formulações 26 e 27 após a exposição ao estresse de luz visível

Ensaio	Nº.	ID Amostra	T0	Estudo de Sensibilidade à Luz Visível				
				Luz Visível		Protegido da Luz		
				5D	10D	5D	10D	
Aparência	F26	20150401	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis	
	F27	20150402		Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis	
Conc. mg/mL	F26	20150401	10,5	10,6	10,6	10,5	10,5	
	F27	20150402	9,7	9,7	9,7	9,8	9,7	
pH	F26	20150401	6,39	6,40	6,39	6,40	6,39	
	F27	20150402	6,51	6,53	6,51	6,52	6,51	
SEC	Pico principal, %	F26	20150401	98,0	97,3	96,3	98,2	98,2
		F27	20150402	98,0	96,8	96,0	98,2	98,2
	Pico HMW, %	F26	20150401	2,0	2,6	3,5	1,8	1,8
		F27	20150402	2,0	3,1	3,8	1,8	1,8
Pico LMW, %	F26	20150401	ND	0,1	0,3	ND	0,1	
	F27	20150402	ND	0,1	0,2	ND	ND	
cIEF	pl	F26	20150401	8,81	NA	8,82	NA	8,82
		F27	20150402	8,82	NA	8,81	NA	8,81
	Pico principal, %	F26	20150401	65,9	NA	59,7	NA	64,5
		F27	20150402	64,6	NA	59,4	NA	64,5
	Pico ácido, %	F26	20150401	31,7	NA	37,2	NA	33,0
		F27	20150402	32,3	NA	37,3	NA	32,3
Pico básico, %	F26	20150401	2,4	NA	3,1	NA	2,5	
	F27	20150402	3,1	NA	3,3	NA	3,2	
Caliper Reduzido	Pureza, %	F26	20150401	97,7	NA	96,3	NA	98,4
		F27	20150402	97,5	NA	95,2	NA	95,8
	Tamanho LC, kDa	F26	20150401	43,9	NA	41,7	NA	41,5
		F27	20150402	43,6	NA	41,9	NA	42,4
Tamanho HC, kDa	F26	20150401	56,8	NA	55,5	NA	55,1	
	F27	20150402	56,8	NA	55,7	NA	56,3	
Caliper Não Reduzido	Pureza, %	F26	20150401	98,0	NA	97,7	NA	98,3
		F27	20150402	98,0	NA	97,9	NA	98,2
	Tamanho, kDa	F26	20150401	169,5	NA	163,9	NA	162,9
		F27	20150402	170,8	NA	160,9	NA	160,8
DLS	Média Z (d.nm)	F26	20150401	15,5	NA	16,2	NA	15,4
		F27	20150402	15,5	NA	15,3	NA	15,2
	Pdl	F26	20150401	0,10	NA	0,13	NA	0,07
		F27	20150402	0,11	NA	0,09	NA	0,08

Estresse de Luz Ultravioleta

[0087] As formulações foram expostas ao estresse de luz ultravioleta de 200 w/m<sup>2</sup> a 25°C por 10 horas. As formulações não exibiram aparência, concentração de proteína, pH, pl, pureza calibradora não reduzida e tamanho médio de partícula ou Pdl por ensaio DLS (Tabela 7) significativamente diferentes. Foram observadas diminuições na pureza da proteína por SEC, cIEF e Caliper reduzido.

Tabela 7. Resultados de SEC, cIEF, Caliper reduzido, Caliper não reduzido, aparência, concentração de proteína, pH para as Formulações 26 e 27 após a exposição ao estresse de luz UV

Ensaio		Nº.	ID Amostra	T0	Estudo de Sensibilidade à Luz UV	
					Luz UV, 10 h	Protegido da luz, 10 h
Aparência		F26	20150401	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis
		F27	20150402			
Conc. mg/mL		F26	20150401	10,7	10,5	10,5
		F27	20150402	10,0	9,8	9,7
pH		F26	20150401	6,42	6,39	6,39
		F27	20150402	6,55	6,51	6,51
SEC	Pico principal, %	F26	20150401	98,0	96,7	98,2
		F27	20150402	98,0	96,2	98,2
	Pico HMW, %	F26	20150401	2,0	3,2	1,8
		F27	20150402	2,0	3,8	1,8
	Pico LMW, %	F26	20150401	ND	0,1	ND
		F27	20150402	ND	0,1	ND
cIEF	pl	F26	20150401	8,81	8,81	8,81
		F27	20150402	8,82	8,81	8,81
	Pico principal, %	F26	20150401	65,9	62,0	66,8
		F27	20150402	64,6	61,7	65,5
	Pico ácido, %	F26	20150401	31,7	35,3	30,4
		F27	20150402	32,3	35,3	31,5
	Pico básico, %	F26	20150401	2,4	2,7	2,8
		F27	20150402	3,1	3,0	3,1
Caliper Reduzido	Pureza, %	F26	20150401	97,7	96,5	97,8
		F27	20150402	97,5	96,5	97,7
	Tamanho LC, kDa	F26	20150401	43,9	43,3	43,1
		F27	20150402	43,6	42,7	42,8
	Tamanho HC, kDa	F26	20150401	56,8	56,4	56,0
		F27	20150402	56,8	55,5	55,7
Caliper Não Reduzido	Pureza, %	F26	20150401	98,0	98,2	98,3
		F27	20150402	98,0	98,2	98,4
	Tamanho, kDa	F26	20150401	169,5	162,1	161,6
		F27	20150402	170,8	163,7	164,5
DLS	Média Z (d.nm)	F26	20150401	15,5	15,2	15,6
		F27	20150402	15,5	15,2	15,3
	Pdl	F26	20150401	0,10	0,08	0,10
		F27	20150402	0,11	0,09	0,08

### Estresse de Oxidação

[0088] As formulações foram expostas ao estresse de oxidação com exposição a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 1% de 2 a 8°C por 6 horas. As formulações não exibiram aparência significativamente diferente, concentração de proteína, pH, pl, pureza SEC, pureza Caliper reduzida e não reduzida, ou tamanho médio de partícula e Pdl por ensaio DLS (Tabela 8). Ligeiras diminuições foram observadas para cIEF.

**Tabela 8.** Resultados de SEC, cIEF, Caliper reduzido, Caliper não reduzido, aparência, concentração de proteína, pH para as Formulações 26 e 27 após exposição ao estresse de oxidação

Ensaio		Nº.	ID Amostra	T0	Oxidação		
					1 h	3 h	6 h
Aparência		F26	20150401	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis
		F27	20150402				
Conc. mg/mL		F26	20150401	10,5	11,3	11,3	
		F27	20150402	9,8	10,5	10,5	
pH		F26	20150401	6,39	6,28	6,30	
		F27	20150402	6,51	6,42	6,42	
SEC	Pico principal, %	F26	20150401	98,1	98,3	98,3	
		F27	20150402	98,1	98,2	98,2	
	Pico HMW, %	F26	20150401	1,9	1,6	1,6	
		F27	20150402	1,9	1,7	1,6	
	Pico LMW, %	F26	20150401	ND	0,1	0,1	
		F27	20150402	ND	0,1	0,1	
cIEF	pl	F26	20150401	8,82	NA	NA	
		F27	20150402	8,82	NA	NA	
	Pico principal, %	F26	20150401	65,8	NA	NA	
		F27	20150402	64,4	NA	Na	
	Pico ácido, %	F26	20150401	31,9	NA	NA	
		F27	20150402				
Pico básico, %	F26	20150401	32,8	NA	NA		
	F27	20150402	2,4	NA	NA		
Caliper Reduzido	Pureza, %	F26	20150401	97,6	NA	NA	
		F27	20150402	97,6	NA	NA	
	Tamanho LC, kDa	F26	20150401	43,9	NA	NA	
		F27	20150402	43,7	NA	NA	
	Tamanho HC, kDa	F26	20150401	57,0	NA	NA	
		F27	20150402	56,8	NA	NA	
Caliper Não Reduzido	Pureza, %	F26	20150401	97,9	NA	NA	
		F27	20150402	98,1	NA	NA	
	Tamanho, kDa	F26	20150401	167,1	NA	NA	
		F27	20150402	166,0	NA	NA	
DLS	Média Z (d.nm)	F26	20150401	15,1	15,8	14,7	
		F27	20150402	15,8	14,9	14,8	
	Pdl	F26	20150401	0,09	0,15	0,09	
		F27	20150402	0,13	0,09	0,09	

### Estresse de Congelamento-Descongelamento

[0089] As formulações foram expostas ao congelamento-descongelamento de -80°C à temperatura ambiente (RT) por até 10 ciclos. As formulações não exibiram aparência, concentração de proteína, pureza SEC, pI, a proporção de pico principal, pico ácido e pico básico do ensaio cIEF, pureza do ensaio Caliper não reduzido e reduzido ou tamanho médio de partícula e Pdl de Ensaio DLS (Tabela 9) significativamente diferentes.

Tabela 9. Resultados de SEC, cIEF, Caliper reduzido, Caliper não reduzido, aparência, concentração de proteína, pH para as Formulações 26 e 27 após exposição ao estresse de oxidação

Ensaio		Nº.	ID Amostra	T0	Congelamento - Descongelamento		
Aparência	F28	20150401-FT	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis	Incolor, límpida, e livre de partículas visíveis	
	F29	20150402-FT					
	F30	20150403-FT					
	F31	20150404-FT					
Conc. mg/mL	F28	20150401-FT	33,9	38,0	38,5	39,1	
	F29	20150402-FT	34,4	37,5	41,2	36,8	
	F30	20150403-FT	29,0	34,0	30,4	32,1	
	F31	20150404-FT	29,2	35,1	29,5	29,5	
pH	F28	20150401-FT	6,40	6,38	6,36	6,37	
	F29	20150402-FT	6,48	6,48	6,45	6,46	
	F30	20150403-FT	6,56	6,54	6,53	6,52	
	F31	20150404-FT	6,53	6,51	6,51	6,51	
Osmolalidade, mOsm/kg	F28	20150401-FT	482	NA	NA	NA	
	F29	20150402-FT	479	NA	NA	NA	
	F30	20150403-FT	113	NA	NA	NA	
	F31	20150404-FT	99	NA	NA	NA	
SEC	Pico principal, %	F28	20150401-FT	97,7	97,7	97,4	97,3
		F29	20150402-FT	97,6	97,6	97,3	97,3
		F30	20150403-FT	97,6	97,5	97,1	97,0
		F31	20150404-FT	97,6	97,6	97,2	97,1
	Pico HMW, %	F28	20150401-FT	2,3	2,3	2,6	2,6
		F29	20150402-FT	2,4	2,4	2,6	2,7
		F30	20150403-FT	2,4	2,5	2,8	2,9
		F31	20150404-FT	2,4	2,4	2,8	2,8
	Pico LMW, %	F28	20150401-FT	ND	ND	ND	0,1
		F29	20150402-FT	ND	ND	ND	ND
		F30	20150403-FT	ND	ND	ND	ND
		F31	20150404-FT	ND	ND	0,1	ND
	F28	20150401-FT	8,83	NA	NA	8,80	
	F29	20150402-FT	8,83	NA	NA	8,79	

cIEF	pl	F30	20150403-FT	8,82	NA	NA	8,79	
		F31	20150404-FT	8,82	NA	NA	8,79	
	Pico principal, %	F28	20150401-FT	65,7	NA	NA	66,1	
		F29	20150402-FT	65,4	NA	NA	66,2	
		F30	20150403-FT	64,2	NA	NA	65,8	
		F31	20150404-FT	64,9	NA	NA	66,2	
	Pico ácido, %	F28	20150401-FT	31,7	NA	NA	30,9	
		F29	20150402-FT	31,8	NA	NA	30,7	
		F30	20150403-FT	32,8	NA	NA	31,1	
		F31	20150404-FT	32,3	NA	NA	30,5	
	Pico básico, %	F28	20150401-FT	2,7	NA	NA	3,0	
		F29	20150402-FT	2,8	NA	NA	3,1	
		F30	20150403-FT	3,0	NA	NA	3,1	
		F31	20150404-FT	2,9	NA	NA	3,2	
	Caliper Reduzido	Pureza, %	F28	20150401-FT	97,7	NA	NA	98,3
			F29	20150402-FT	97,5	NA	NA	97,8
F30			20150403-FT	97,5	NA	NA	97,8	
F31			20150404-FT	97,6	NA	NA	98,4	
Tamanho LC, kDa		F28	20150401-FT	43,5	NA	NA	42,9	
		F29	20150402-FT	43,7	NA	NA	43,4	
		F30	20150403-FT	43,7	NA	NA	43,3	
		F31	20150404-FT	43,8	NA	NA	42,9	
Tamanho HC, kDa		F28	20150401-FT	56,5	NA	NA	56,5	
		F29	20150402-FT	56,7	NA	NA	57,1	
		F30	20150403-FT	57,0	NA	NA	57,3	
		F31	20150404-FT	57,0	NA	NA	56,8	
Caliper Não Reduzido	Pureza, %	F28	20150401-FT	97,9	NA	NA	98,2	
		F29	20150402-FT	97,9	NA	NA	98,3	
		F30	20150403-FT	97,7	NA	NA	98,1	
		F31	20150404-FT	97,7	NA	NA	98,1	
	Tamanho, kDa	F28	20150401-FT	170,1	NA	NA	162,0	
		F29	20150402-FT	169,7	NA	NA	161,4	
		F30	20150403-FT	169,7	NA	NA	162,5	
		F31	20150404-FT	169,9	NA	NA	163,0	
DLS	Média Z (d.nm)	F28	20150401-FT	19,19	NA	NA	19,88	
		F29	20150402-FT	19,34	NA	NA	19,96	
		F30	20150403-FT	14,49	NA	NA	14,51	
		F31	20150404-FT	14,68	NA	NA	14,87	
	Pdl	F28	20150401-FT	0,095	NA	NA	0,098	
		F29	20150402-FT	0,094	NA	NA	0,089	
		F30	20150403-FT	0,056	NA	NA	0,075	
		F31	20150404-FT	0,066	NA	NA	0,077	

[0090] As formulações selecionadas testadas mantiveram a estabilidade quando expostas a estresses mecânicos, térmicos e químicos. As formulações tamponadas com fosfato de sódio ou

succinato de sódio exibiram estabilidade similar em todas as condições de estresse testadas e qualquer um dos sistemas de tamponamento seria apropriado.

Exemplo 3. Determinar se a formulação contendo fosfato de sódio 25 mM, cloreto de sódio 25 mM, trealose 8,7%, PS 80 0,01% tamponado em pH 6,5 fornece estabilidade adequada para injeção de 10 mg/ml e 30 mg/ml de M281

[0091] Para determinar se as formulações contendo fosfato de sódio 25 mM, cloreto de sódio 25 mM, trealose 8,7%, PS80 0,01% peso/volume tamponado em pH 6,5 fornecem estabilidade adequada para injeção de 10 mg/mL e 30 mg/mL de M281, as propriedades das formulações foram avaliadas por ensaios analíticos após exposição a estresses térmicos e de cisalhamento.

[0092] As formulações contendo de fosfato de sódio 25 mM, cloreto de sódio 25 mM, trealose 8,7%, PS80 0,01% peso/volume e 10 mg/ml ou 30 mg/ml de M281 tamponado com pH 6,5 foram preparadas. Uma variedade de ensaios analíticos foi usada para avaliar a qualidade do produto como parte desses estudos. Dos atributos avaliados, as alterações mais substanciais ao longo dos estudos foram observadas nas variantes de carga medidas por cIEF e níveis de agregação medidos por SEC. Portanto, cIEF e SEC foram selecionados como ensaios indicadores de estabilidade. Variantes de carga por cIEF (Figura 12) e agregados solúveis por SEC (Figura 13) para o medicamento a 10 mg/mL (Lote E, Lote F e Lote B) e 30 mg/mL (Lote D) foram comparados em estudos de estabilidade a longo prazo e acelerada. A taxa de degradação das principais espécies para o medicamento M281 por cIEF e SEC a 10 mg/mL e 30 mg/mL é comparável em ambas as condições de armazenamento de longo prazo (2 a 8°C) e em condições de armazenamento acelerado (25°C).

[0093] Os dados dos estudos de degradação forçada, tal como

agitação, oxidação, estresse térmico e de cisalhamento, são mostrados na Tabela 10 à Tabela 13. Os dados mostram degradação similar em formulações de 10 mg/mL e 30 mg/mL, conforme medido pelos ensaios cIEF e SEC.

**Tabela 10:** Comparação dos níveis % de espécies principais sob agitação por SEC-HPLC e cIEF

<b>Agitação (dias)</b>	<b>% de Principais SEC</b>		<b>% de Principais cIEF</b>	
	<b>10 mg/mL Ab</b>	<b>30 mg/mL Ab</b>	<b>10 mg/mL Ab</b>	<b>30 mg/mL Ab</b>
0	98,0	98,4	65,9	65,6
5	97,9	98,1	NT	NT
10	97,3	98,0	64,2	64,5

cIEF = focalização isoelétrica capilar; NT = não testado;  
SEC-HPLC = cromatografia por exclusão de tamanho – cromatografia líquida de alto desempenho

**Tabela 11:** Comparação de % dos níveis de espécies principais sob oxidação por SEC-HPLC e cIEF

<b>Oxidação (horas)</b>	<b>% de Principais SEC</b>		<b>% de Principais cIEF</b>	
	<b>10 mg/mL Ab</b>	<b>30 mg/mL Ab</b>	<b>10 mg/mL Ab</b>	<b>30 mg/mL Ab</b>
0	98,1	98,4	65,8	65,6
1	98,3	98,3	NT	NT
3	98,3	98,4	NT	NT
6	98,4	98,4	62,7	65,0

cIEF = focalização isoelétrica capilar; NT = não testado;  
SEC-HPLC = cromatografia por exclusão de tamanho – cromatografia líquida de alto desempenho

**Tabela 12:** Comparação dos níveis de % das espécies principais sob

estresse térmico a 40° C por SEC-HPLC e cIEF.

Térmico (dias)	% de Principais SEC		% de Principais cIEF	
	10 mg/mL Ab	30 mg/mL Ab	10 mg/mL Ab	30 mg/mL Ab
0	98,0	98,4	65,9	65,6
5	98,1	97,0	NT	NT
10	97,8	96,7	54,3	54,6

cIEF = focalização isoelétrica capilar; NT = não testado;  
SEC-HPLC = cromatografia por exclusão de tamanho – cromatografia líquida de alto desempenho

**Tabela 13:** Comparação de % dos níveis de espécies principais sob estresse de cisalhamento por SEC-HPLC e cIEF

Estresse de cisalhamento (ciclos) <sup>2</sup>	% de Principais SEC		% de Principais cIEF	
	10 mg/mL Ab	30 mg/mL Ab	10 mg/mL Ab	30 mg/mL Ab
0	98,4	98,2	68,7	67,2
1	98,4	98,3	68,4	67,2
5	98,3	98,2	67,9	67,4
10	98,3	98,2	68,0	66,6

<sup>1</sup> cIEF = focalização isoelétrica capilar; NT = não testado;  
SEC-HPLC = cromatografia por exclusão de tamanho – cromatografia líquida de alto desempenho

<sup>2</sup> Os ciclos referem-se ao número de vezes que M281 foi recirculado através da bomba de enchimento para o cenário de pior caso simulado

[0094] Os resultados das taxas de degradação observadas a partir

da degradação forçada e de dados de estabilidade gerados (Figuras 14 a 23) indicam taxas de degradação similares para formulações contendo fosfato de sódio 25 mM, cloreto de sódio 25 mM, trealose 8,7%, polissorbato 80 0,01% e 10 ou 30 mg/ml de anticorpo tamponado em pH 6,5. Os dados indicam que uma formulação de fosfato de sódio 25 mM, cloreto de sódio 25 mM, trealose 8,7% em peso, polissorbato 80 0,01% peso/volume, pH 6,5, fornece estabilidade tanto em 10 mg/mL quanto em 30 mg/mL, até 30 meses e 18 meses, respectivamente.

[0095] O impacto de níveis mais elevados de polissorbato 80 em partículas sub-visíveis tanto em amostras estáticas quanto em amostras agitadas foi examinado em uma formulação que continha o anticorpo, fosfato de sódio 25 mM, cloreto de sódio 25 mM, trealose 8,7%, PS 80 0,01% e 10 ou 30 mg/ml de anticorpo tamponado em pH 6,5. Partículas sub-visíveis nas amostras de formulação foram analisadas quanto ao seu tamanho e morfologia usando um sistema de imagem de partículas FlowCAM. Resumidamente, as alíquotas de formulações foram desgaseificadas por 30 minutos a 75 torr e 500 µL de cada amostra foram injetados no analisador. Imagens em tempo real das partículas no fluido foram capturadas à medida que passavam pela célula de fluxo. A contagem total de partículas enumerando todas as partículas na amostra foi coletada e é apresentada na Tabela 14. A contagem de partículas subtraídas para as formulações foi gerada pela aplicação de um filtro digital aos dados brutos para eliminar contribuições devido à repetição não proteínica e partículas circulares (por exemplo, provavelmente bolhas) e é apresentada na Tabela 15. Nesta análise, as partículas que são menores que 5 µm são consideradas muito pequenas para filtração precisa ou subtração na análise de imagem de partículas.

**Tabela 15:** Impacto do Polissorbato 80 em Partículas Sub-visíveis  
(Dados Brutos)

<b>Tamanho</b>	<b>Água</b>	<b>PS80 a 0,01% estático</b>	<b>PS80 a 0,05% estático</b>	<b>PS80 a 0,10% estático</b>	<b>PS80 a 0,01% em agitação</b>	<b>PS80 a 0,05% em agitação</b>	<b>PS80 a 0,10% em agitação</b>
> 2 µm	18	10154	24210	2588	4658	2521	661
> 5 µm	0	4787	10688	1053	1630	1270	249
> 10 µm	0	1492	3563	351	474	298	57
> 25 µm	0	210	476	110	36	10	10

**Tabela 16:** Impacto do Polissorbato 80 em Partículas Sub-visíveis  
(Dados Subtraídos)

<b>Tamanho</b>	<b>Água</b>	<b>PS80 a 0,01% estático</b>	<b>PS80 a 0,05% estático</b>	<b>PS80 a 0,10% estático</b>	<b>PS80 a 0,01% em agitação</b>	<b>PS80 a 0,05% em agitação</b>	<b>PS80 a 0,10% em agitação</b>
> 5 µm	0	4787	10688	1053	1569	1184	192
> 10 µm	0	1492	3563	351	474	298	57
> 25 µm	0	210	476	110	36	10	10

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende:

um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N<sup>o</sup>: 2 com até 5 inserções, substituições ou deleções de aminoácidos simples e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N<sup>o</sup>: 1 com até 5 inserções, substituições ou deleções de aminoácidos simples a 10 ou 30 mg/ml, fosfato de sódio 20 a 30 mM, cloreto de sódio 20 a 30 mM, trealose 80 a 100 mg/ml e Polissorbato 80 0,10 a 0,005% peso/volume, tamponado em pH 6,5.

2. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende fosfato de sódio 25 mM.

3. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende cloreto de sódio 25 mM.

4. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que compreende trealose 90 a 91 mg/ml.

5. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que compreende trealose 90,5 mg/ml.

6. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que compreende Polissorbato 80 0,01% peso/volume.

7. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende fosfato de sódio 25 mM, cloreto de sódio 25 mM, trealose 90,5 mg/ml e Polissorbato 80 0,01%.

8. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que a composição não compreende quaisquer excipientes adicionais.

9. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N<sup>o</sup>: 2 com até duas inserções, substituições ou deleções de aminoácidos simples e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N<sup>o</sup>: 1 com até duas inserções, substituições ou deleções de aminoácidos simples.

10. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N<sup>o</sup>: 2 com até duas substituições de aminoácidos simples e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N<sup>o</sup>: 1 com até duas substituições de aminoácidos simples.

11. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N<sup>o</sup>: 2 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N<sup>o</sup>: 1.

12. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende: um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N<sup>o</sup>: 2 com até 5 inserções, substituições ou deleções de aminoácidos simples e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N<sup>o</sup>: 1 com até 5 inserções, substituições ou deleções de aminoácidos simples a 10 ou 30 mg/ml, succinato de sódio 20 a 30 mM, cloreto de sódio 20 a 30 mM, trealose 89 a 92 mg/ml e Polissorbato 80 0,1 a 0,005% peso/volume, tamponado em pH 6,5.

13. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que compreende succinato de sódio 25 mM.

14. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que compreende cloreto de sódio 25 mM.

15. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 14, caracterizada pelo fato de que compreende trealose 90 a 91 mg/ml.

16. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que compreende trealose 90,5 mg/ml.

17. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 14, caracterizada pelo fato de que compreende Polissorbato 80 0,01% peso/volume.

18. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que compreende succinato de sódio 25 mM, cloreto de sódio 25 mM, trealose 90,5 mg/ml e polissorbato 80 0,01%.

19. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 18, caracterizada pelo fato de que a composição não compreende quaisquer excipientes adicionais.

20. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N<sup>o</sup>: 2 com até duas inserções, substituições ou deleções de aminoácidos simples e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N<sup>o</sup>: 1 com até duas inserções, substituições ou deleções de aminoácidos simples.

21. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N<sup>o</sup>: 2 com até duas substituições de

aminoácidos simples e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 com até duas substituições de aminoácidos simples.

22. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 2 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 1.

23. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que o anticorpo compreende uma cadeia pesada consistindo da sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 2 e uma cadeia leve consistindo da sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 1.

24. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que a composição não compreende qualquer polissorbato além de Polissorbato 80.

25. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que a composição não inclui quaisquer polímeros além de um polissorbato.

26. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que a composição não inclui quaisquer polímeros além de Polissorbato 80.

-----	235-20150301	.....	235-20150310
-----	235-20150302	.....	235-20150311
-----	235-20150303	.....	235-20150312
-----	235-20150304	-----	235-20150313
-----	235-20150305	-----	235-20150314
-----	235-20150306	-----	235-20150315
-----	235-20150307	-----	235-20150316
-----	235-20150308	.....	235-20150317
.....	235-20150309	-----	235-20150318

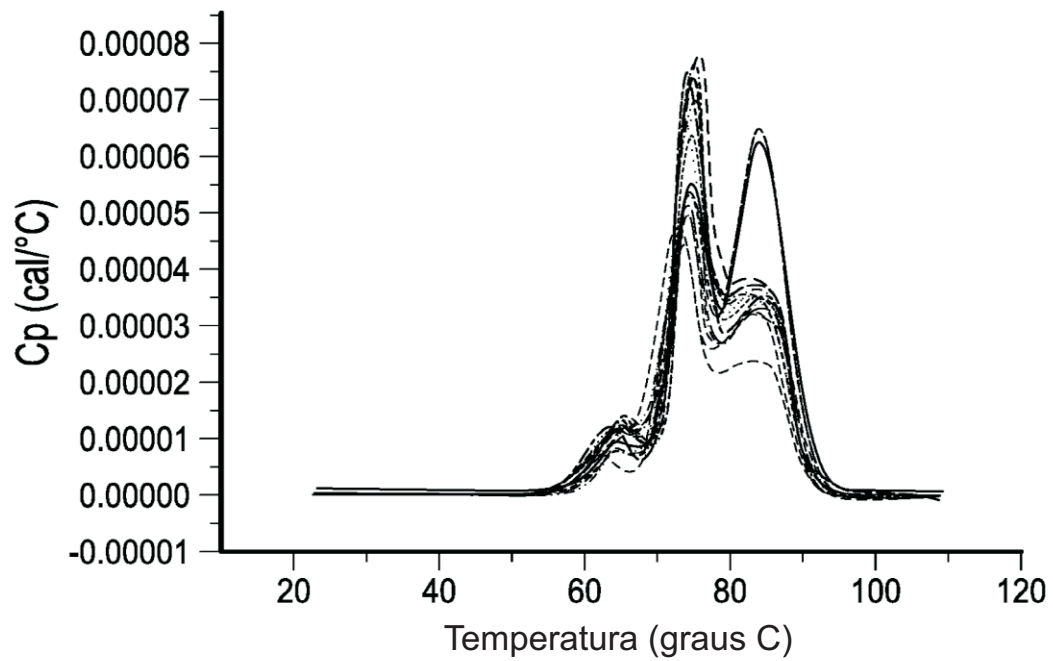


FIG. 1

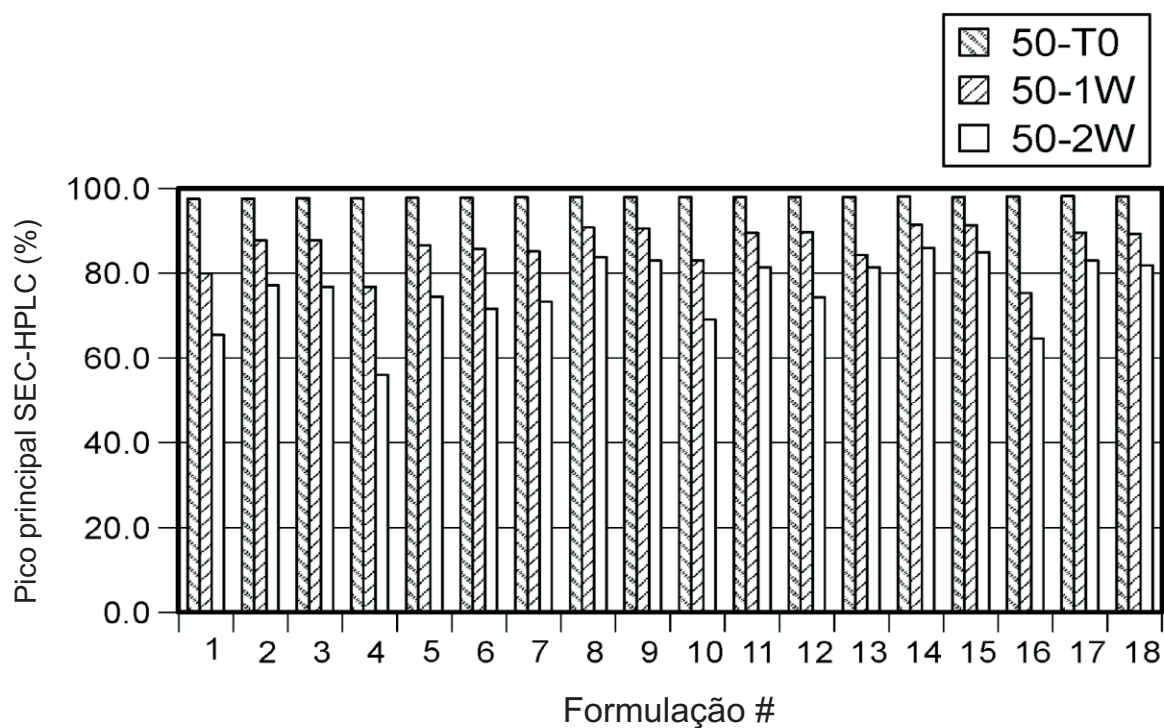


FIG. 2

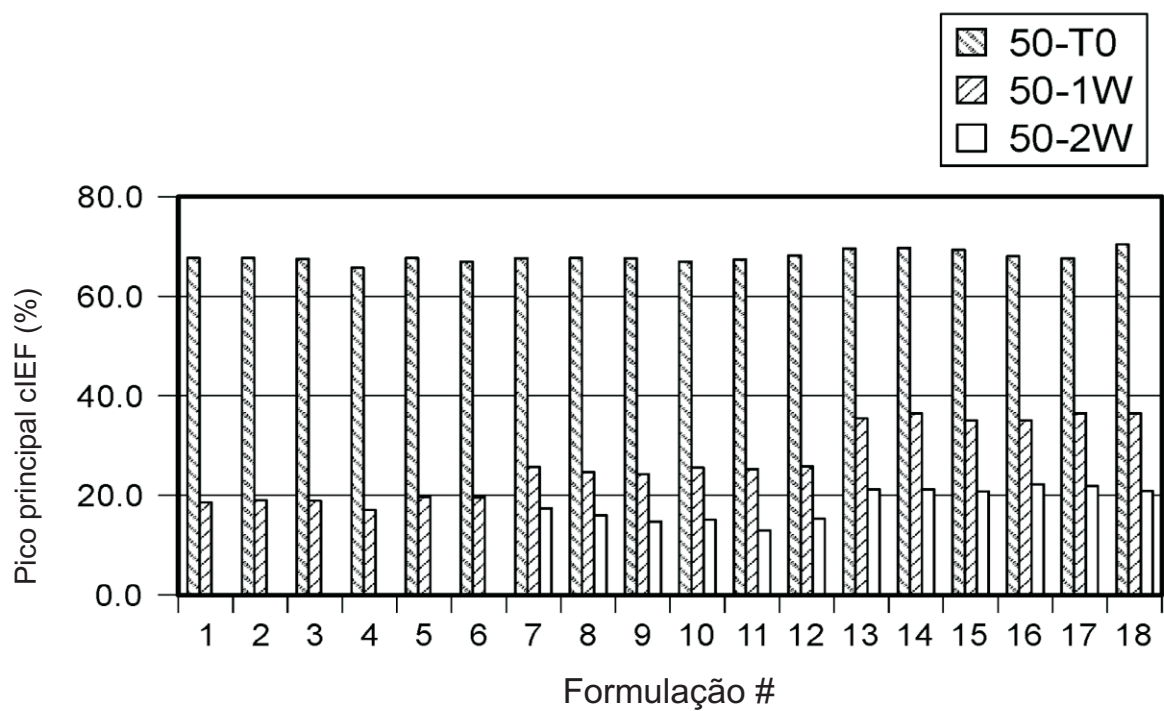


FIG. 3

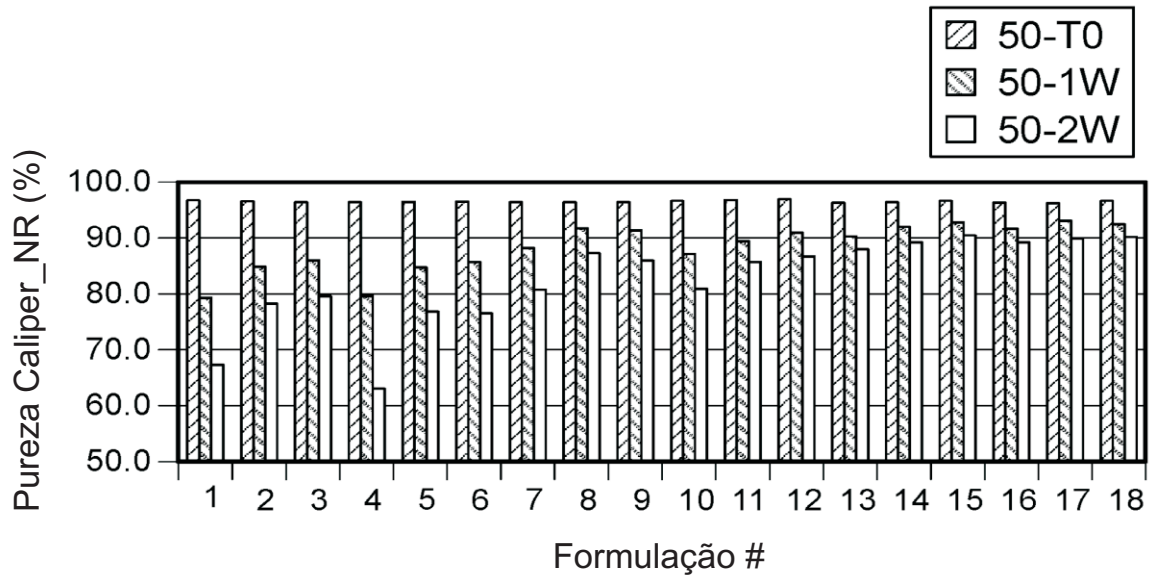


FIG. 4

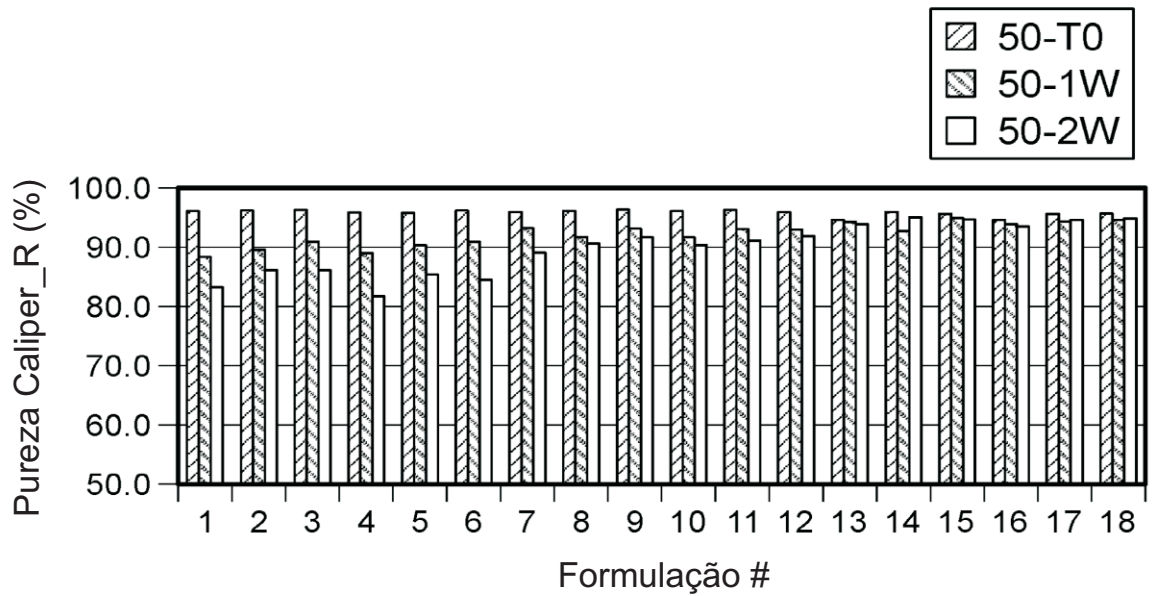


FIG. 5

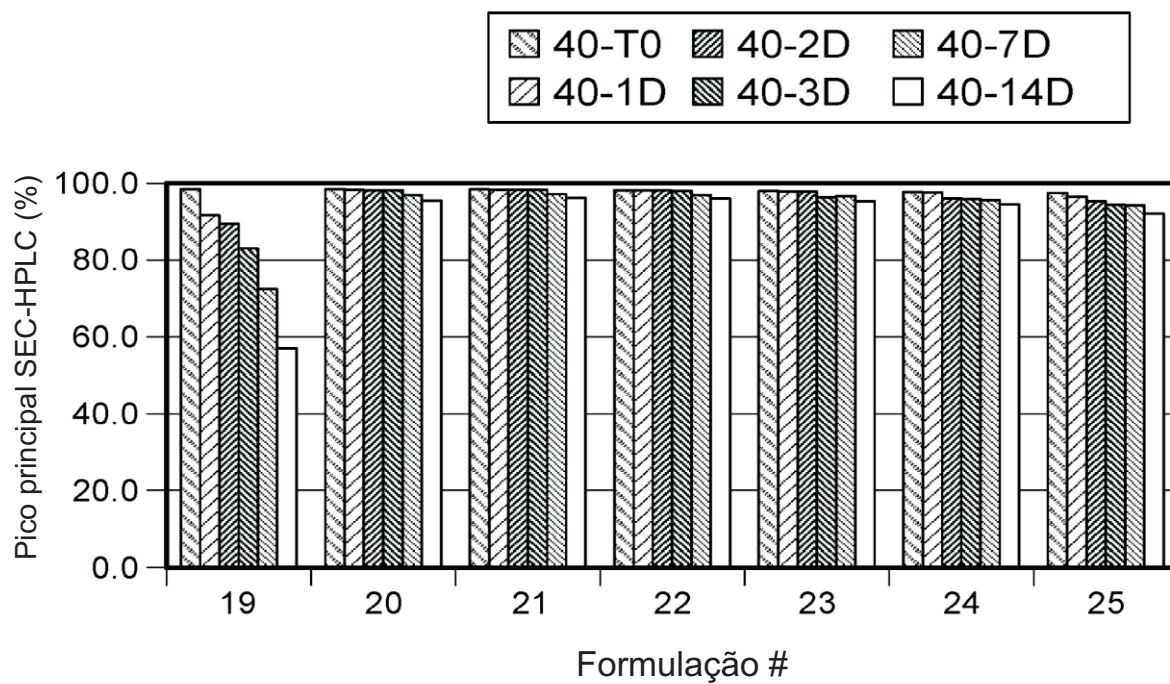


FIG. 6

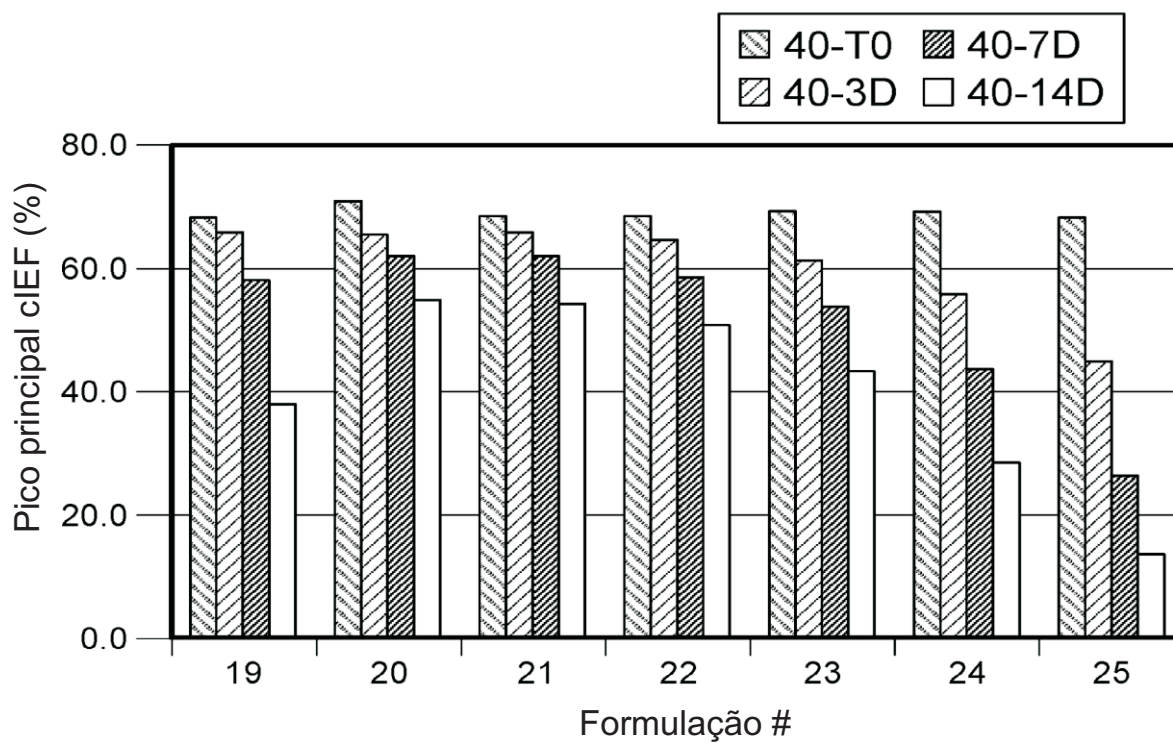
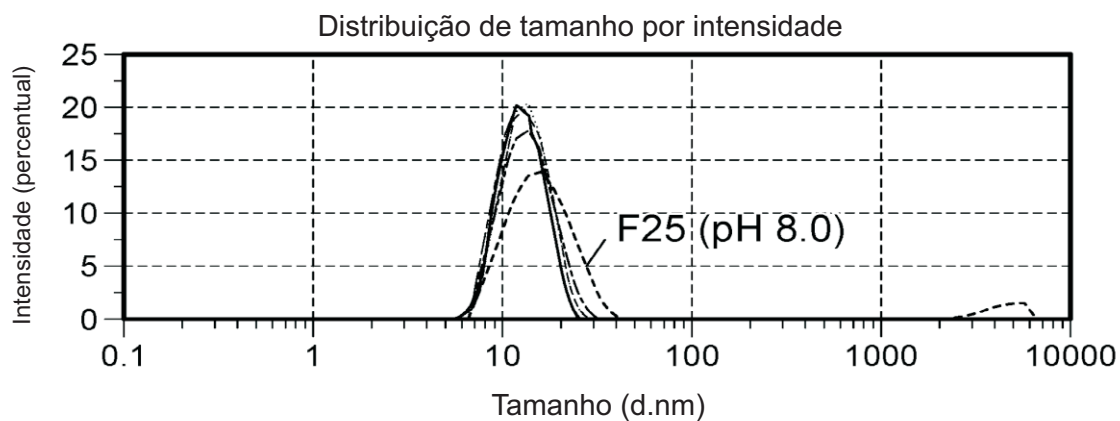
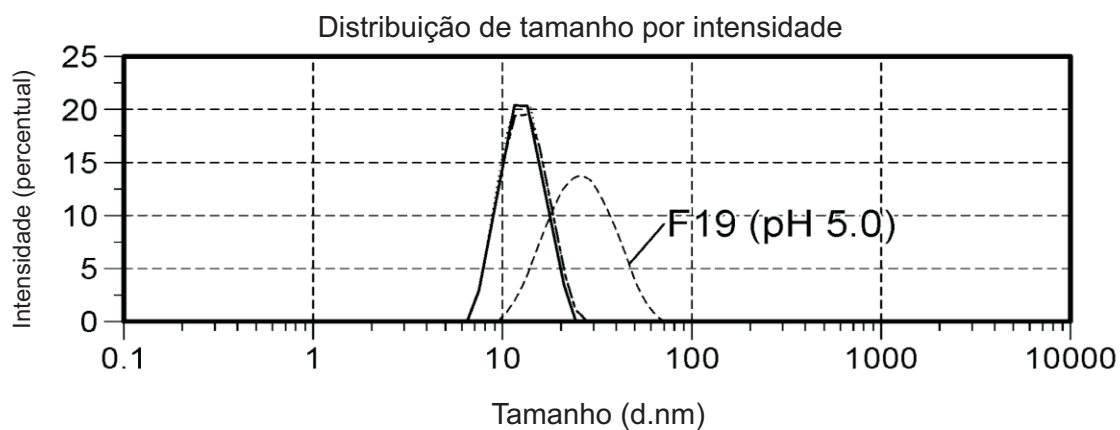


FIG. 7



-----	235-20150319-T0	-----	235-20150320-T0
-----	235-20150321-T0	-----	235-20150322-T0
-----	235-20150323-T0	-----	235-20150324-T0
.....	235-20150325-T0		



-----	235-20150319-40-14D	-----	235-20150320-40-14D
-----	235-20150321-40-14D	-----	235-20150322-40-14D
-----	235-20150323-40-14D	-----	235-20150324-40-14D
.....	235-20150325-40-14D		

FIG. 8

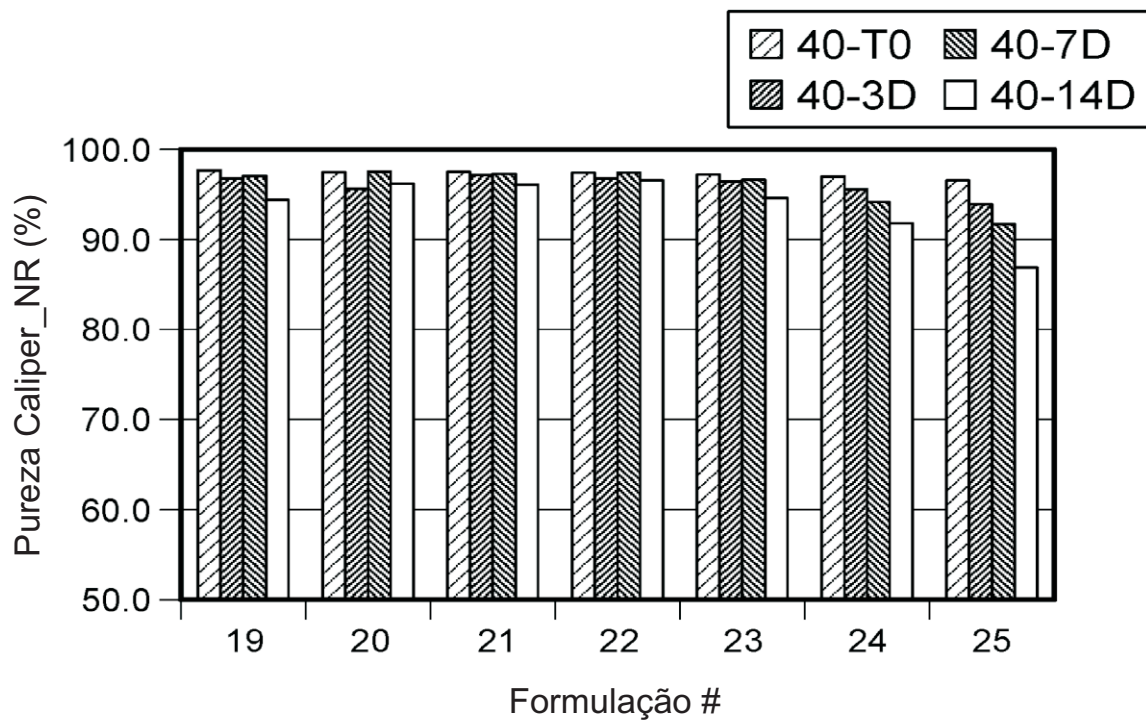


FIG. 9

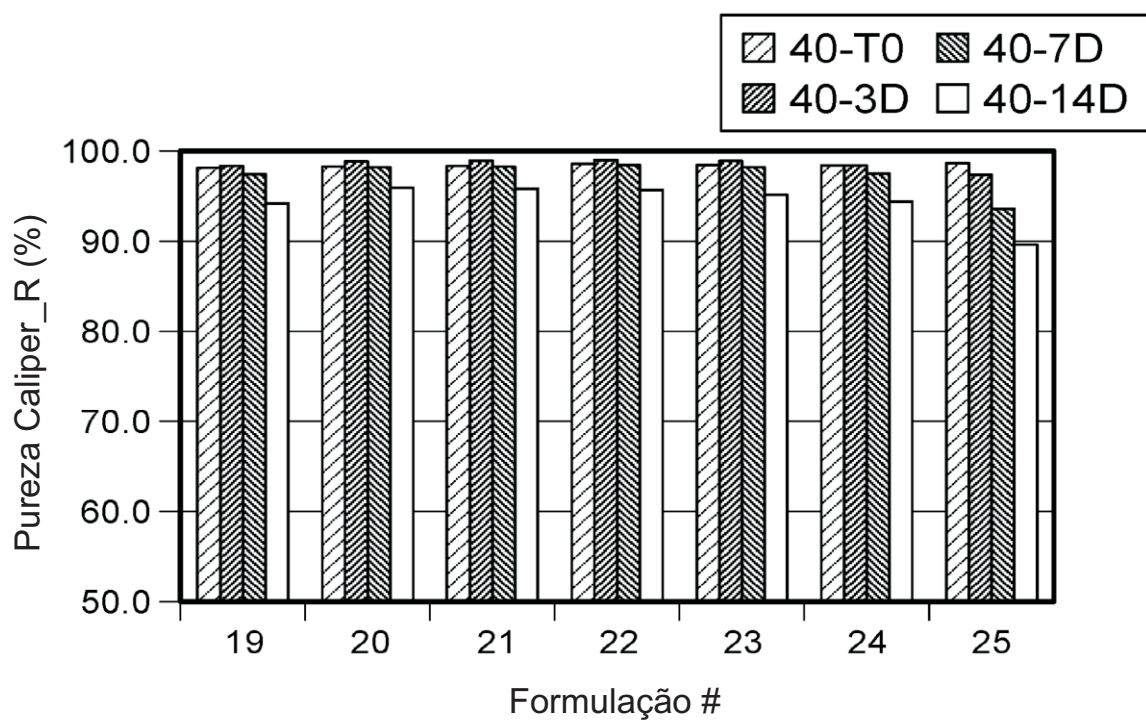


FIG. 10

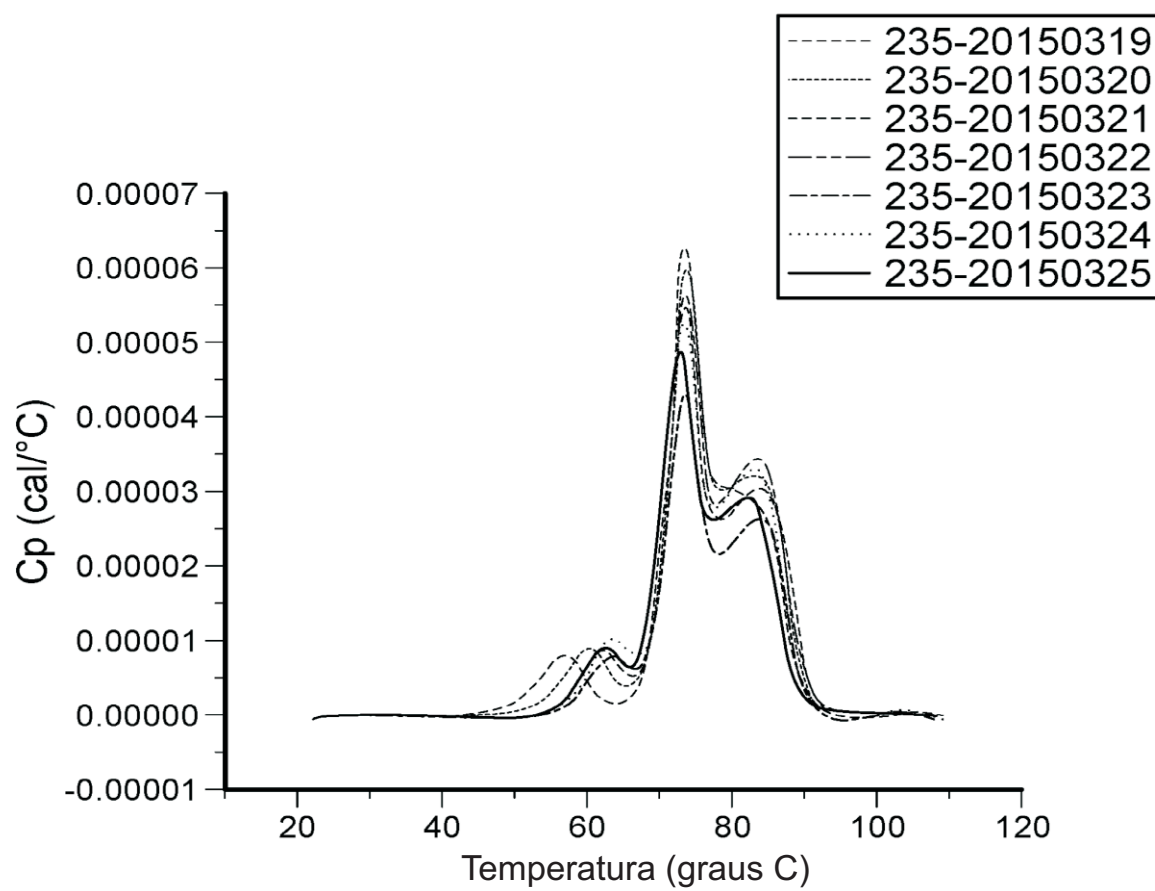


FIG. 11

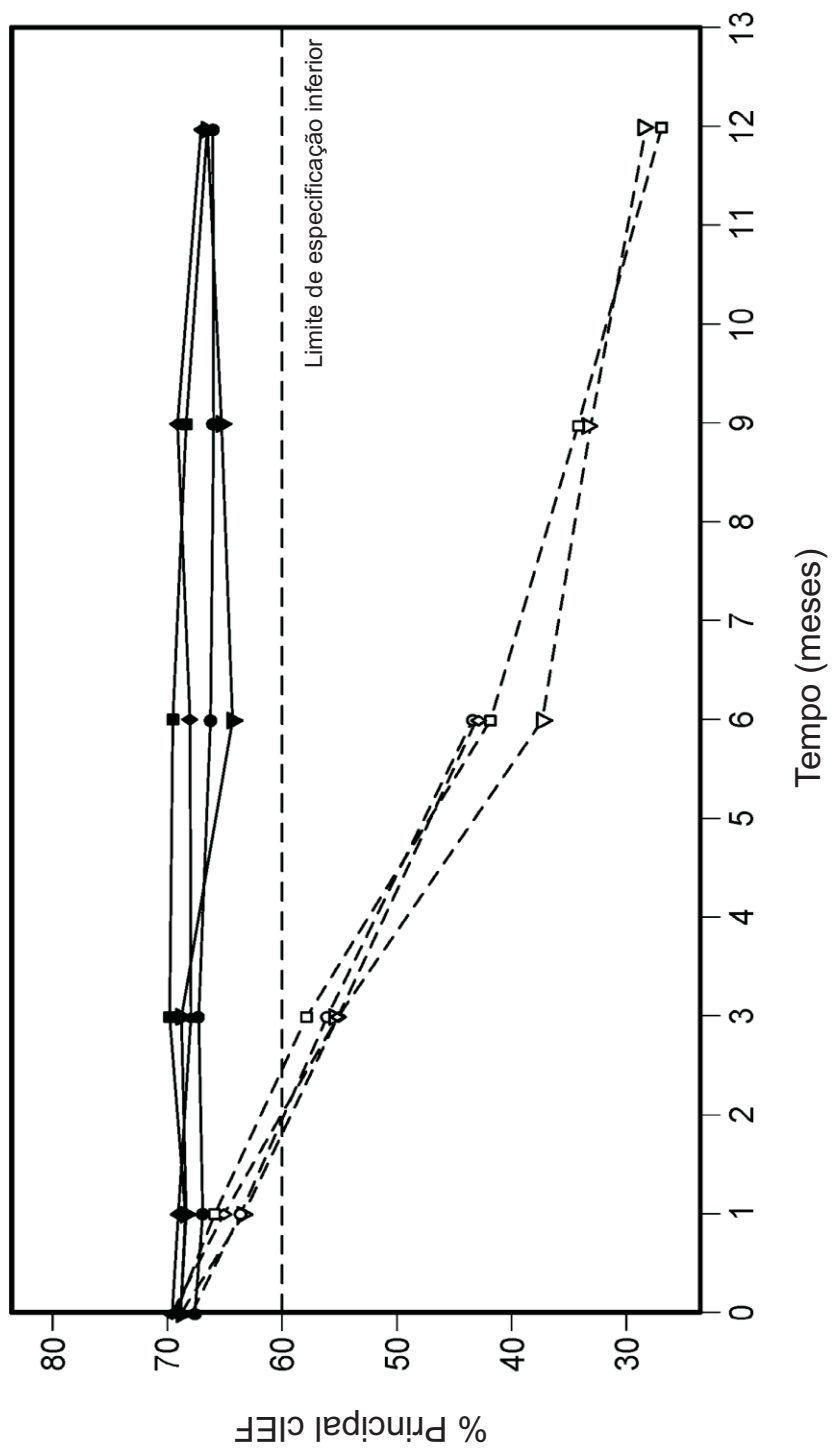


FIG.12

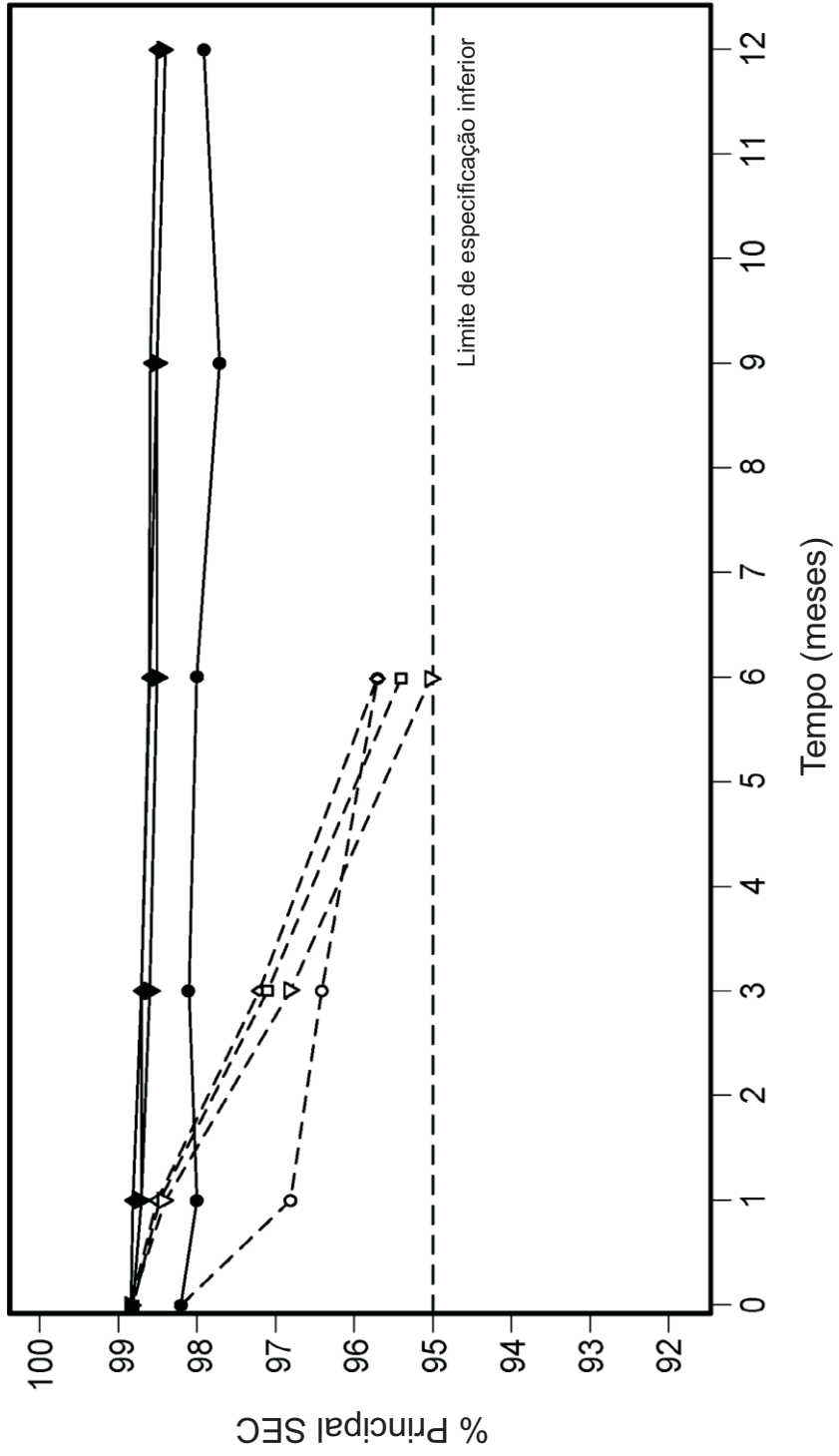


FIG. 13

10/29

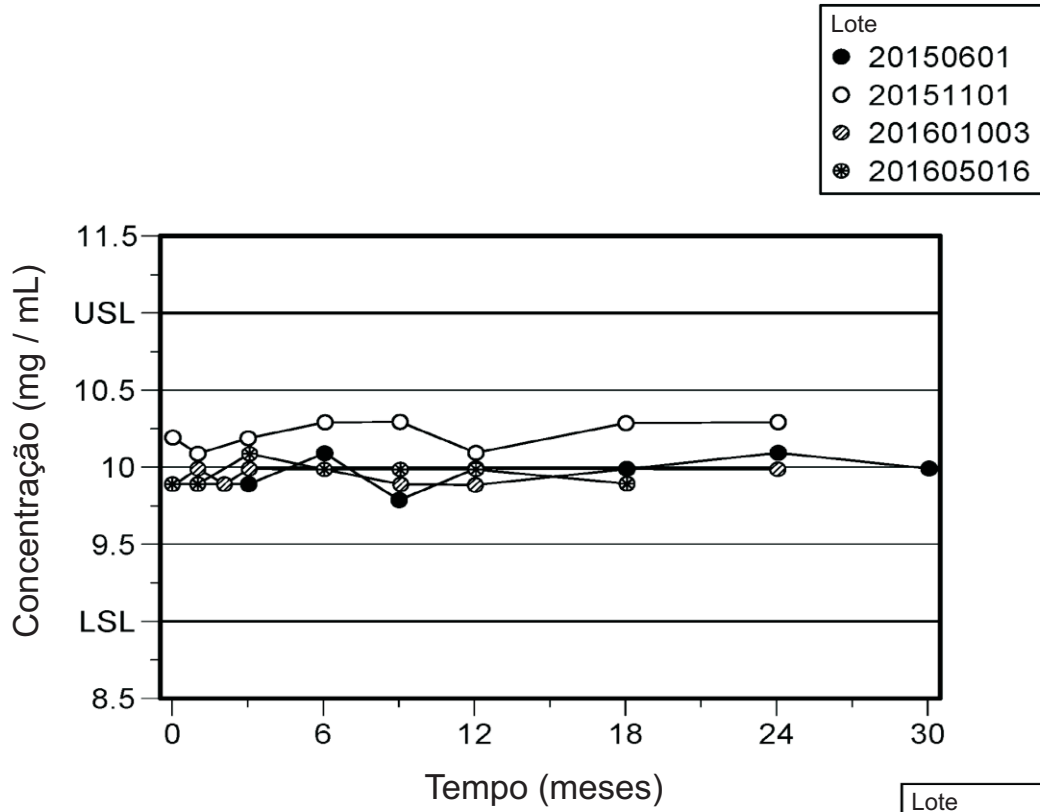


FIG. 14A

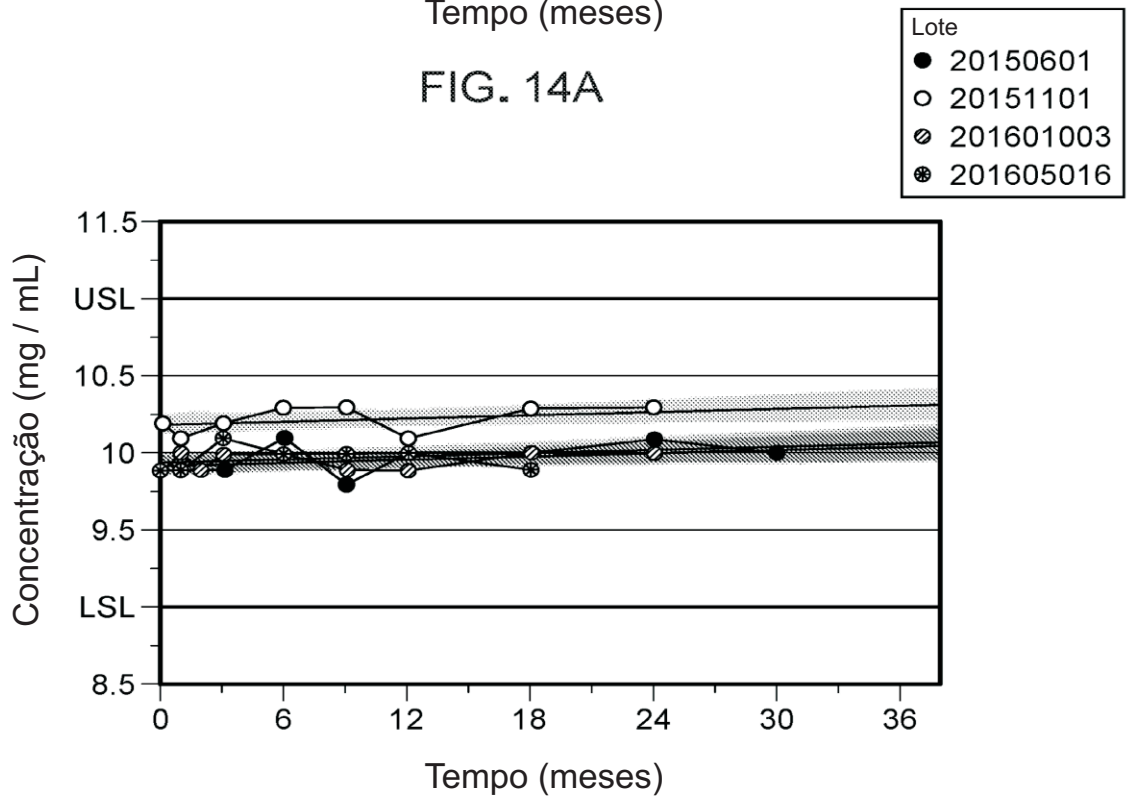


FIG. 14B

11/29

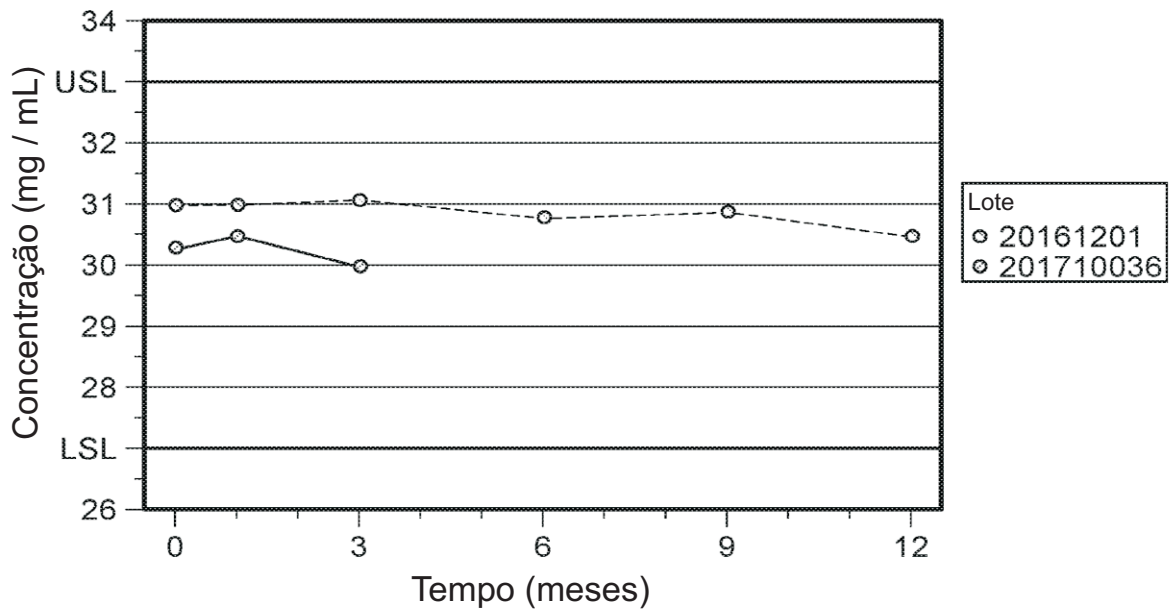


FIG. 14C

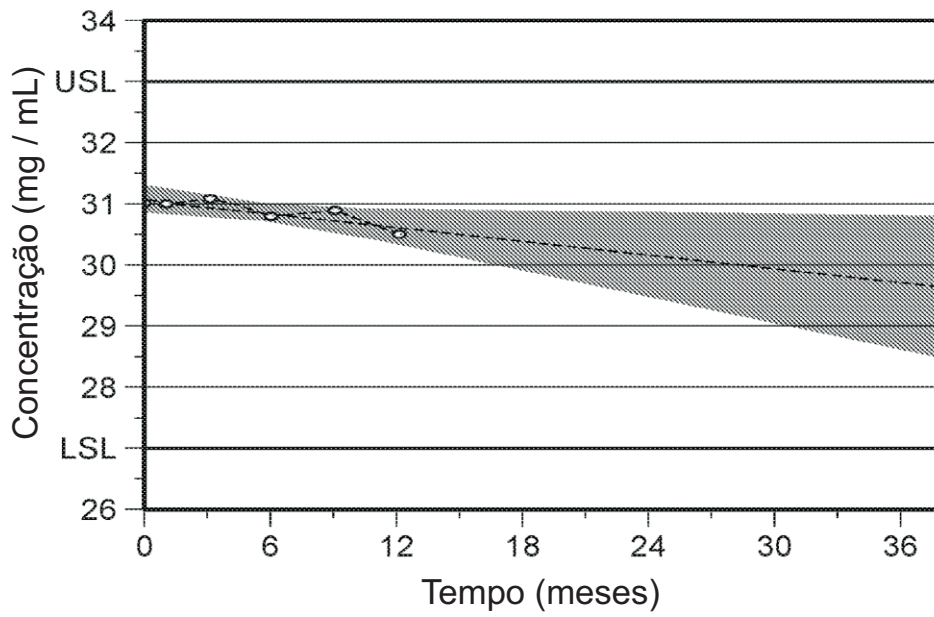


FIG. 14D

12/29

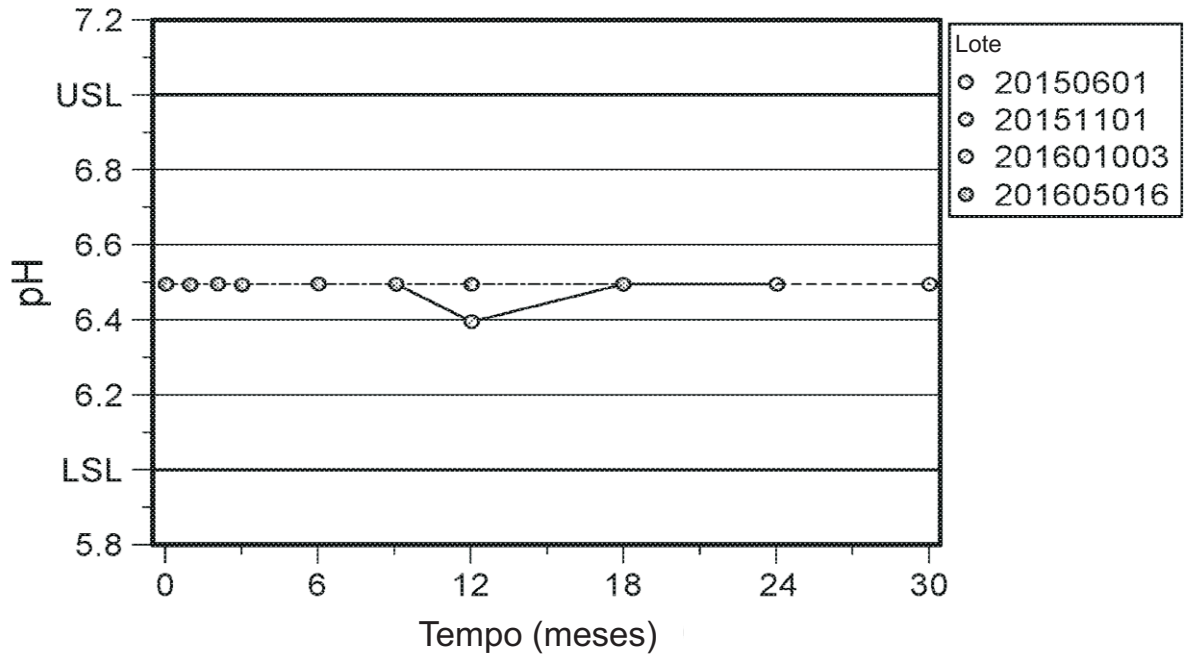


FIG. 15A

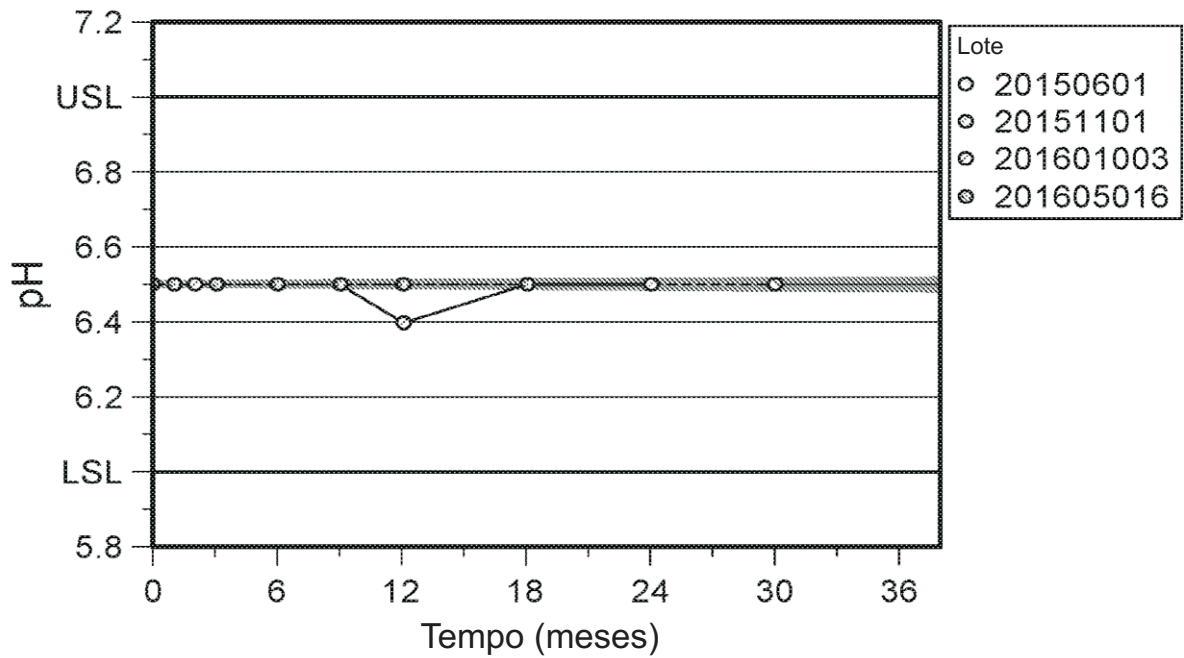


FIG. 15B

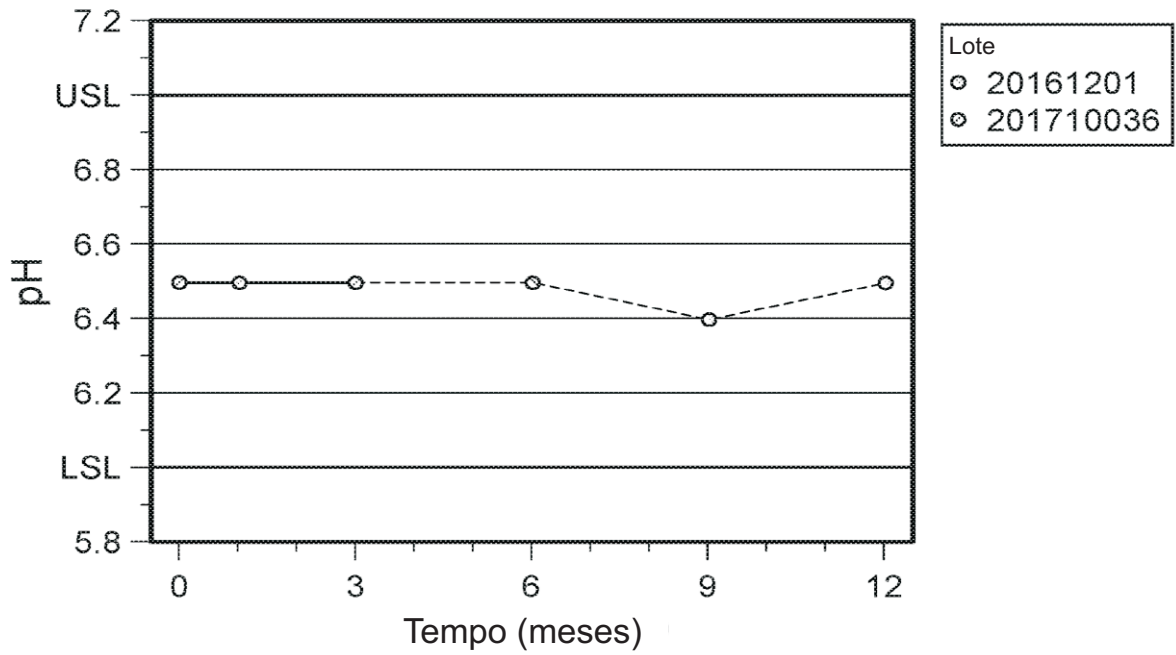


FIG. 15C

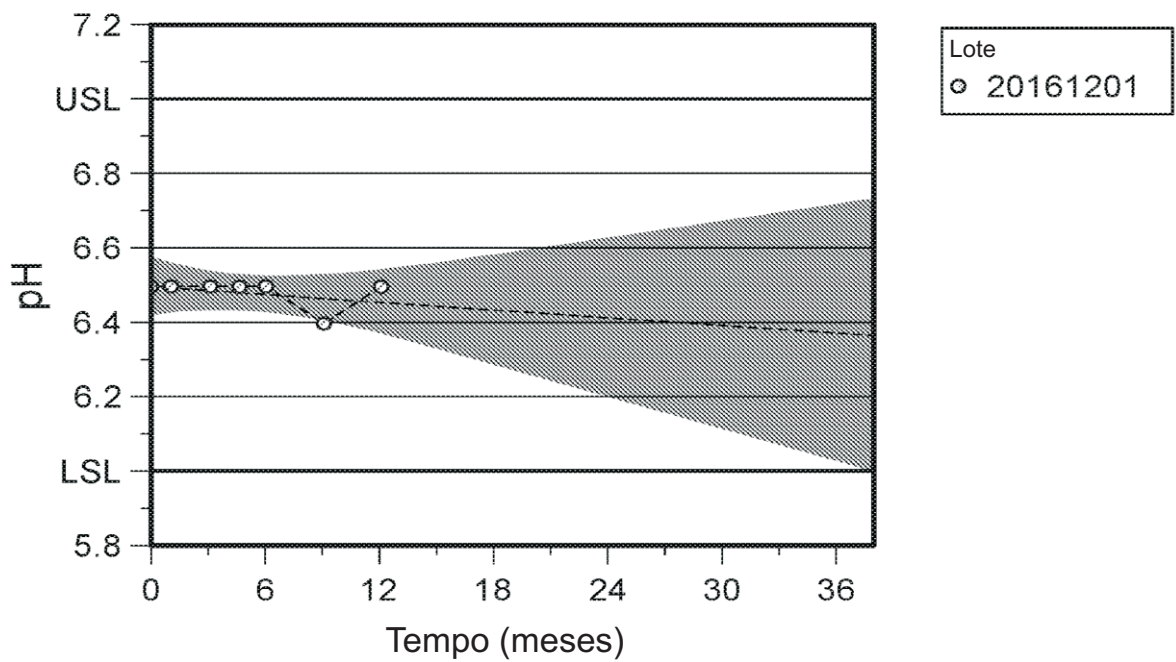


FIG. 15D

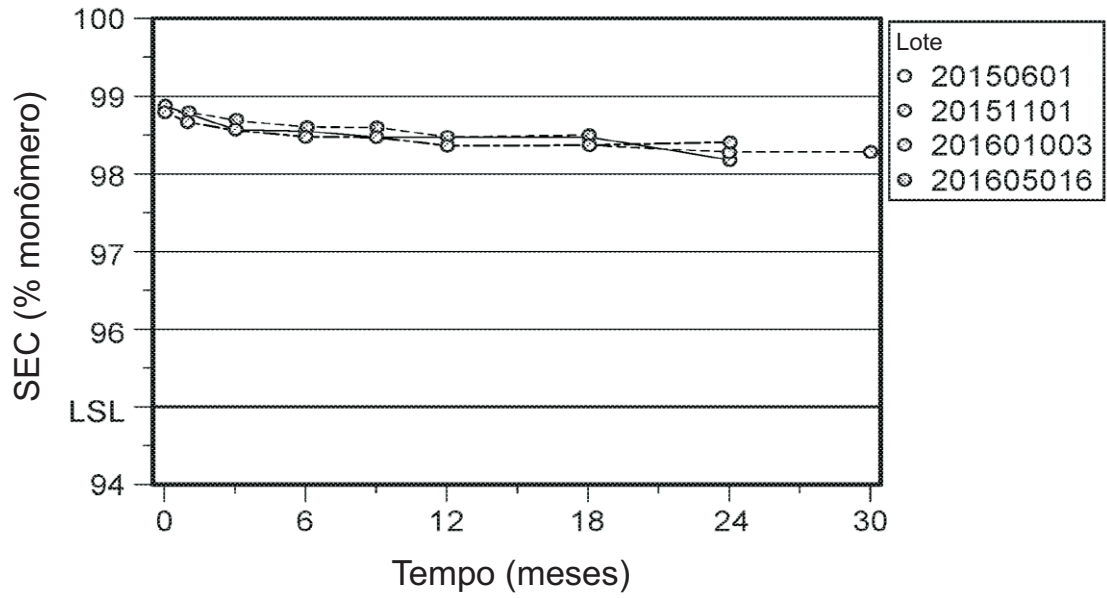


FIG. 16A

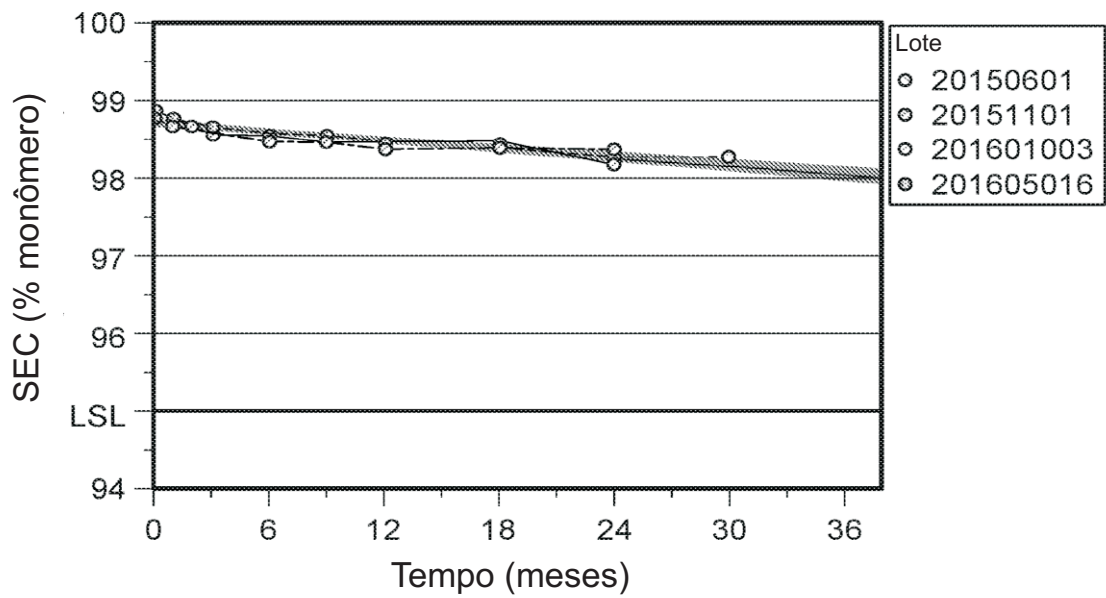


FIG. 16B

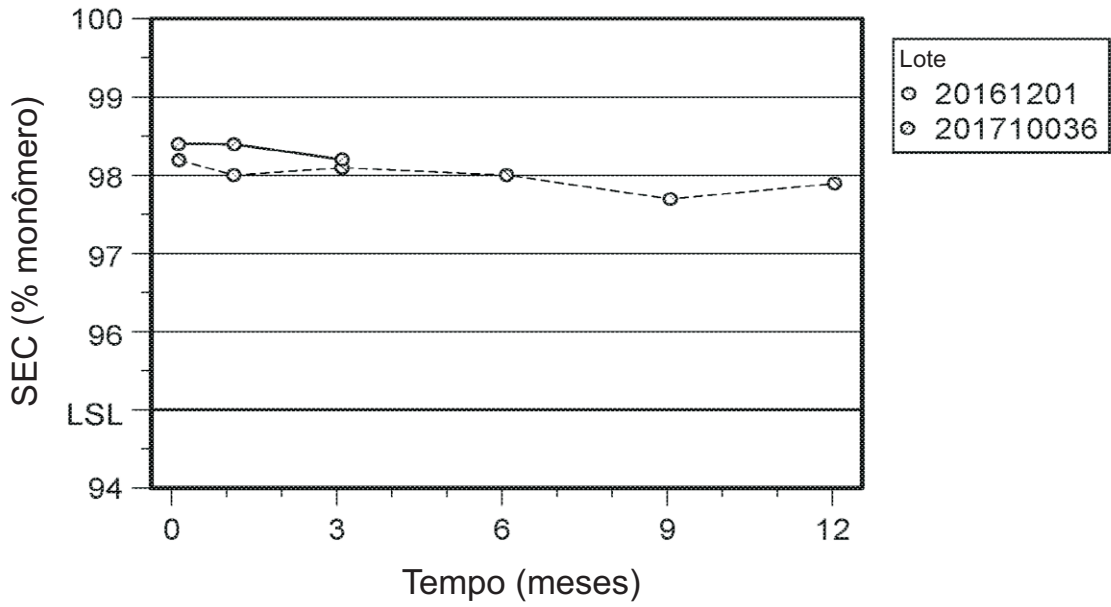


FIG. 16C

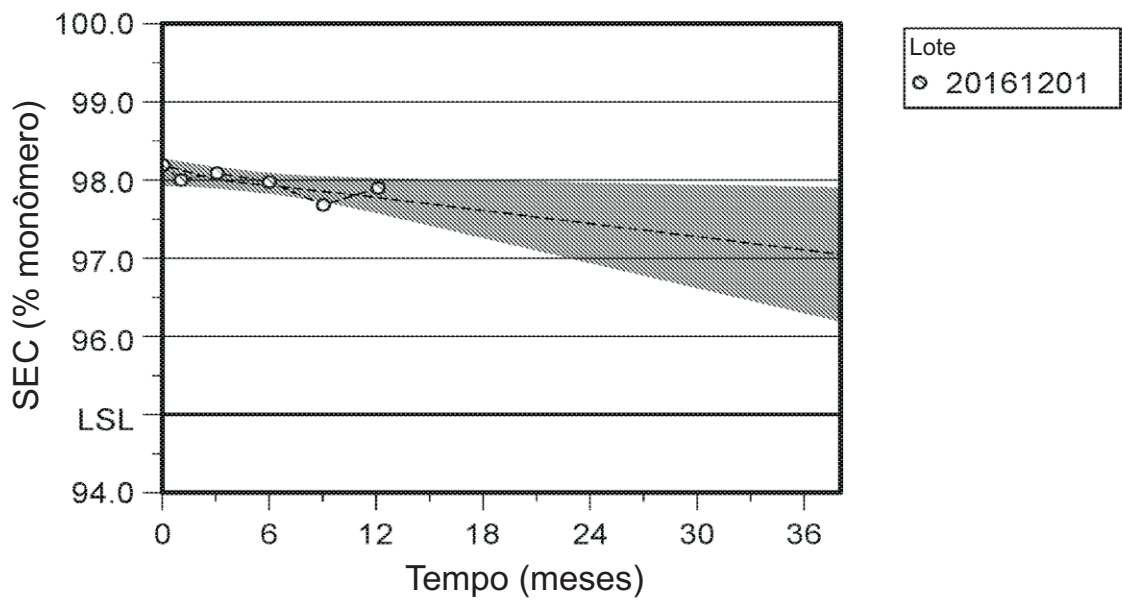


FIG. 16D

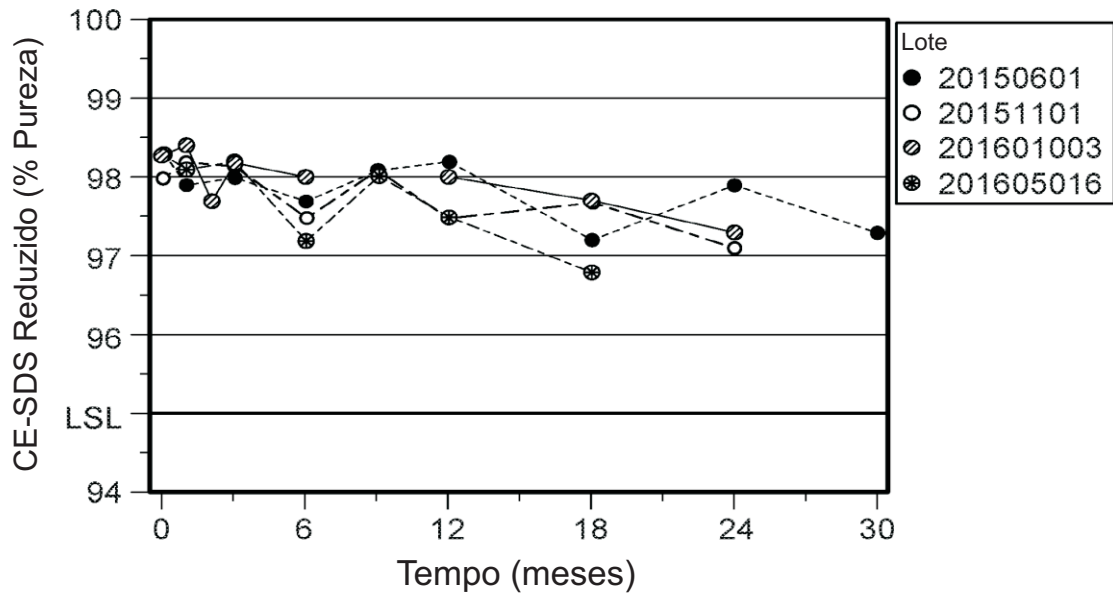


FIG. 17A

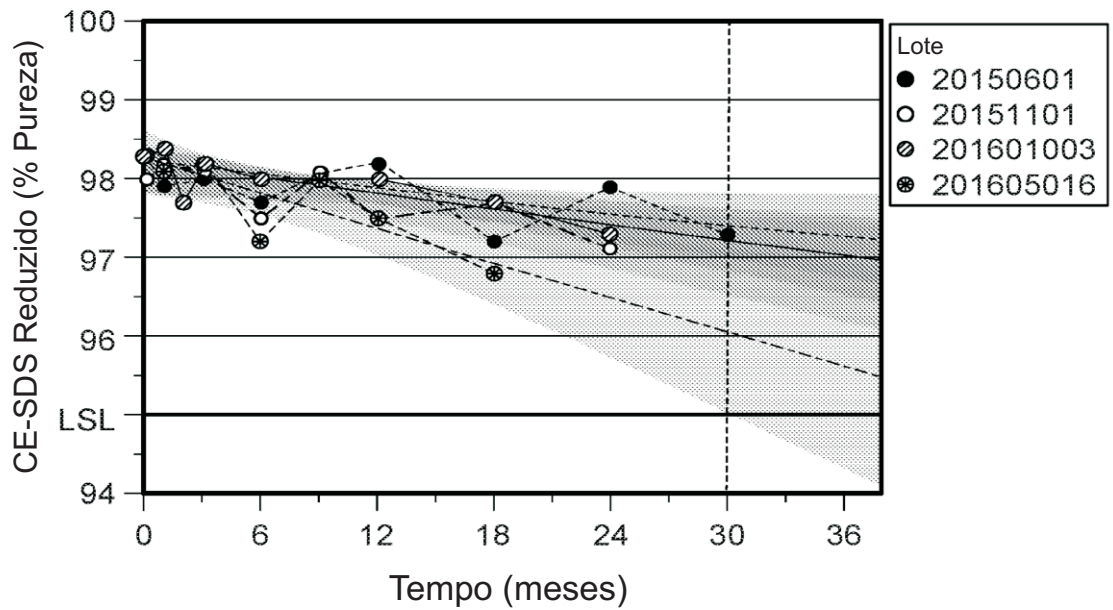


FIG. 17B

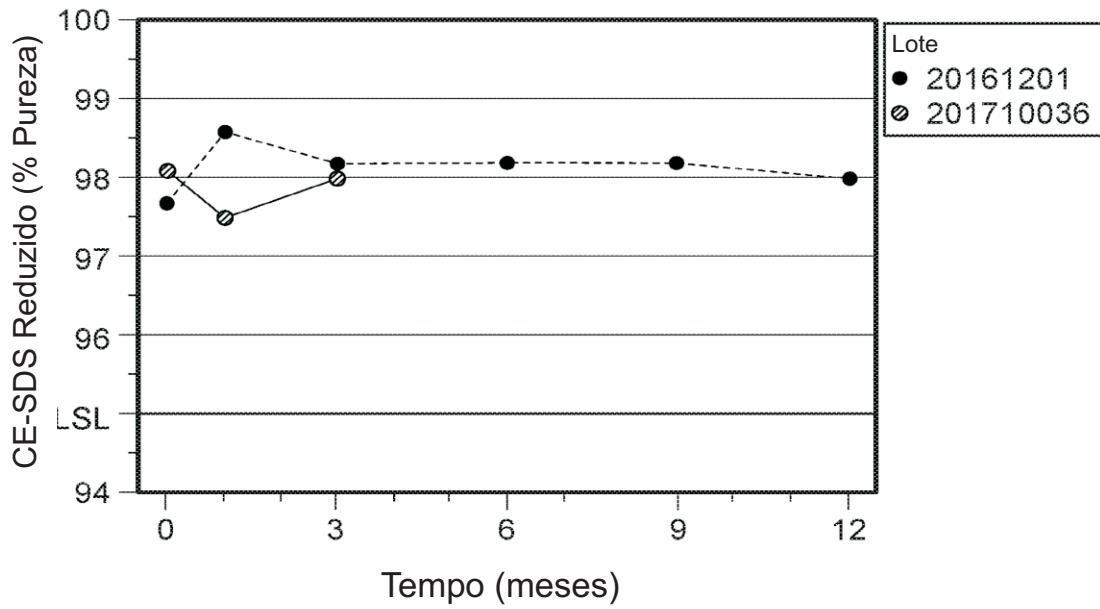


FIG. 17C

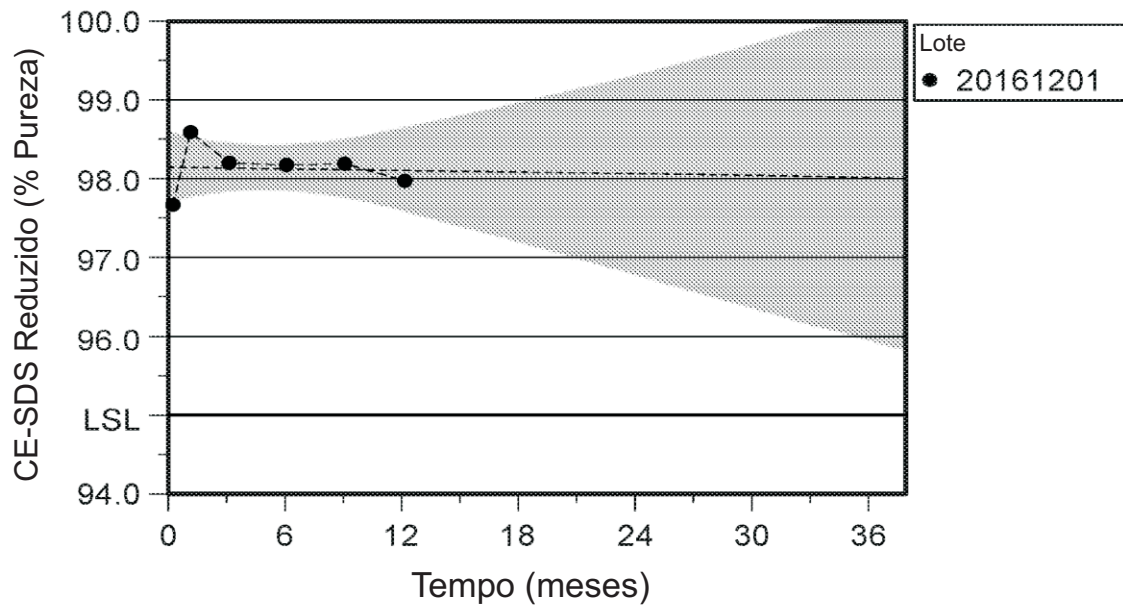


FIG. 17D

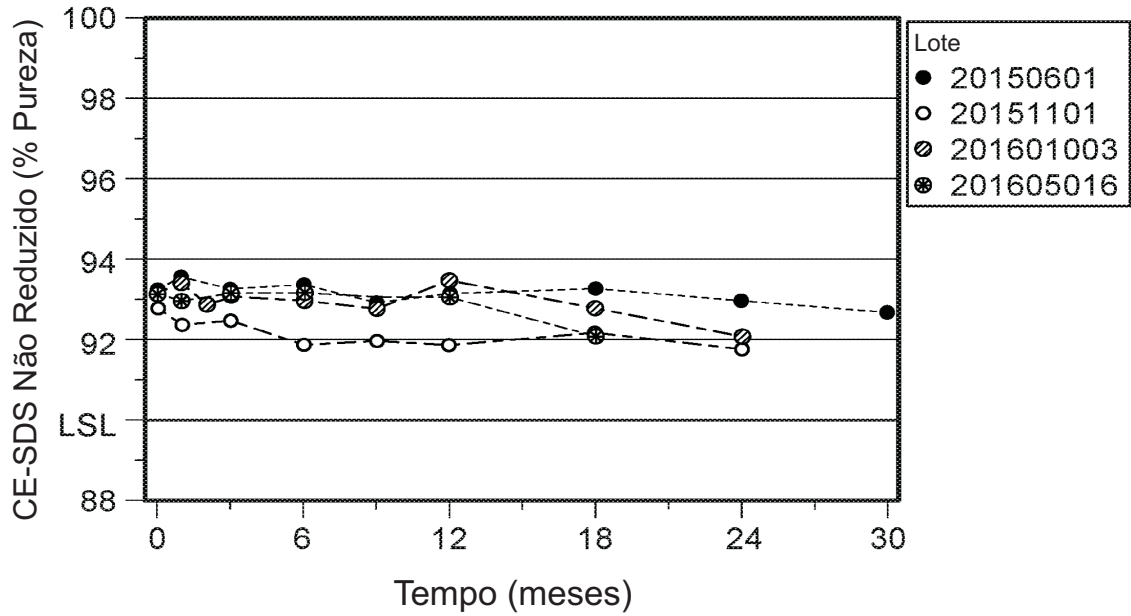


FIG. 18A

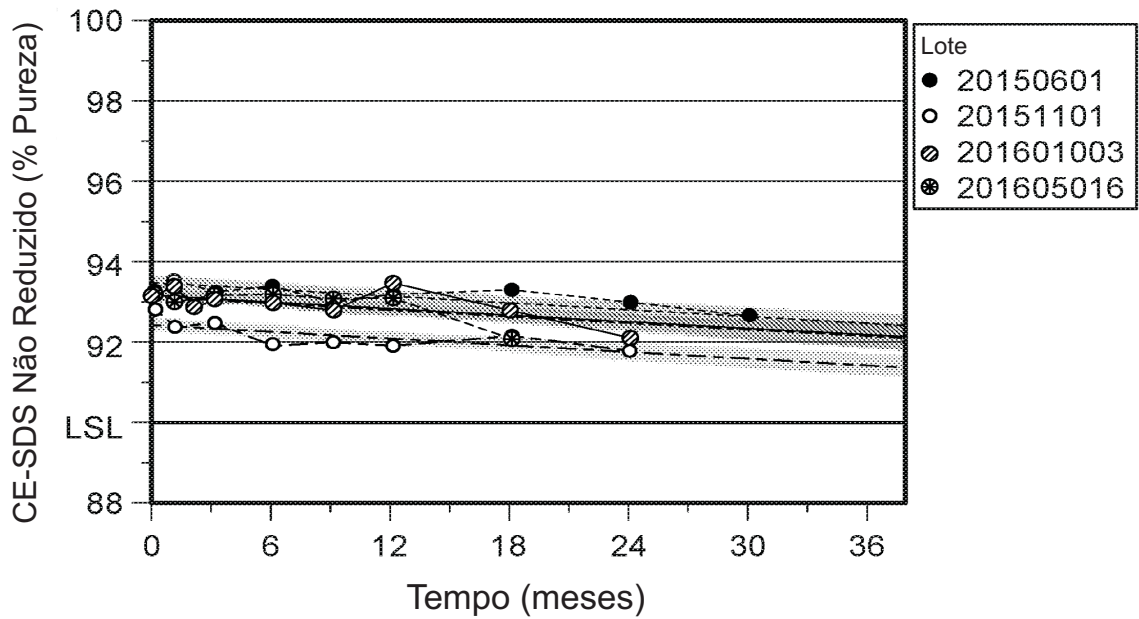


FIG. 18B

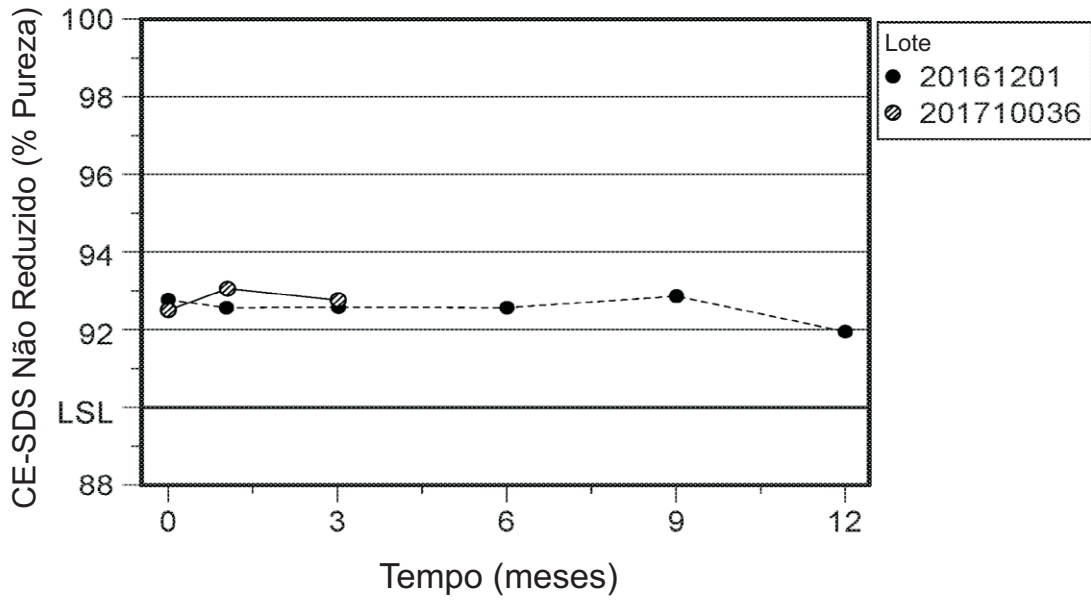


FIG. 18C

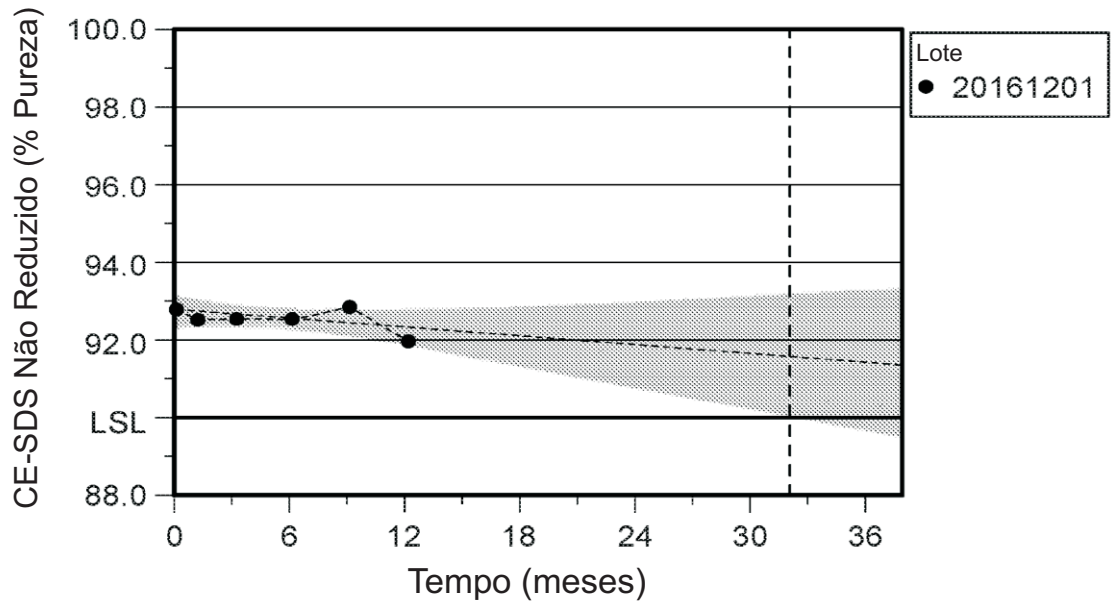


FIG. 18D

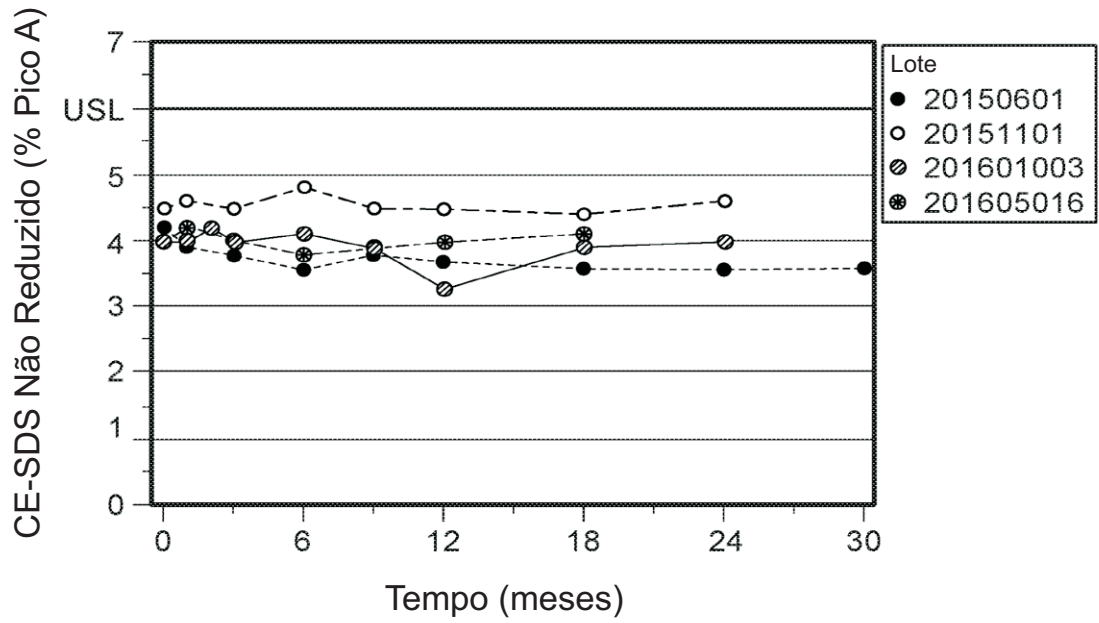


FIG. 19A

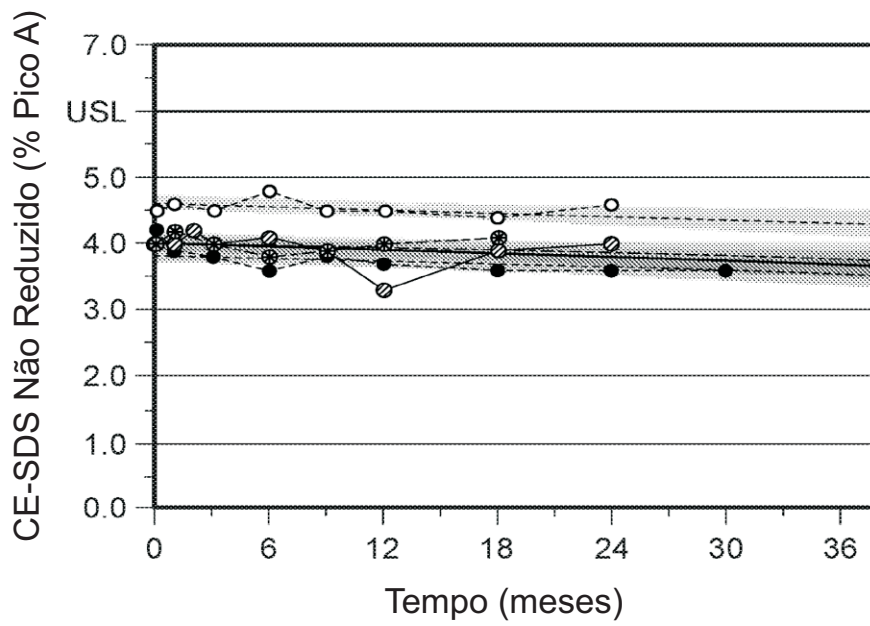


FIG. 19B

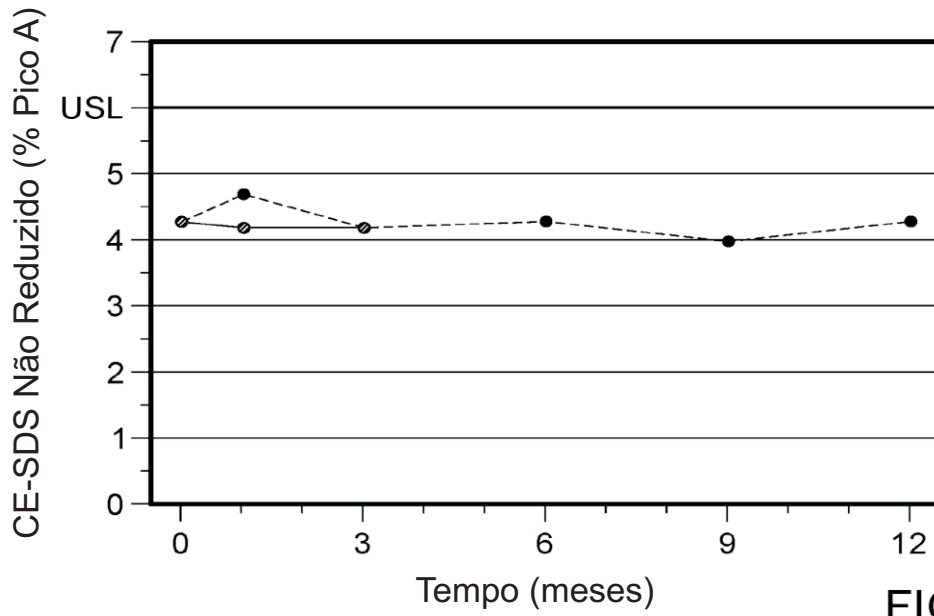


FIG. 19C

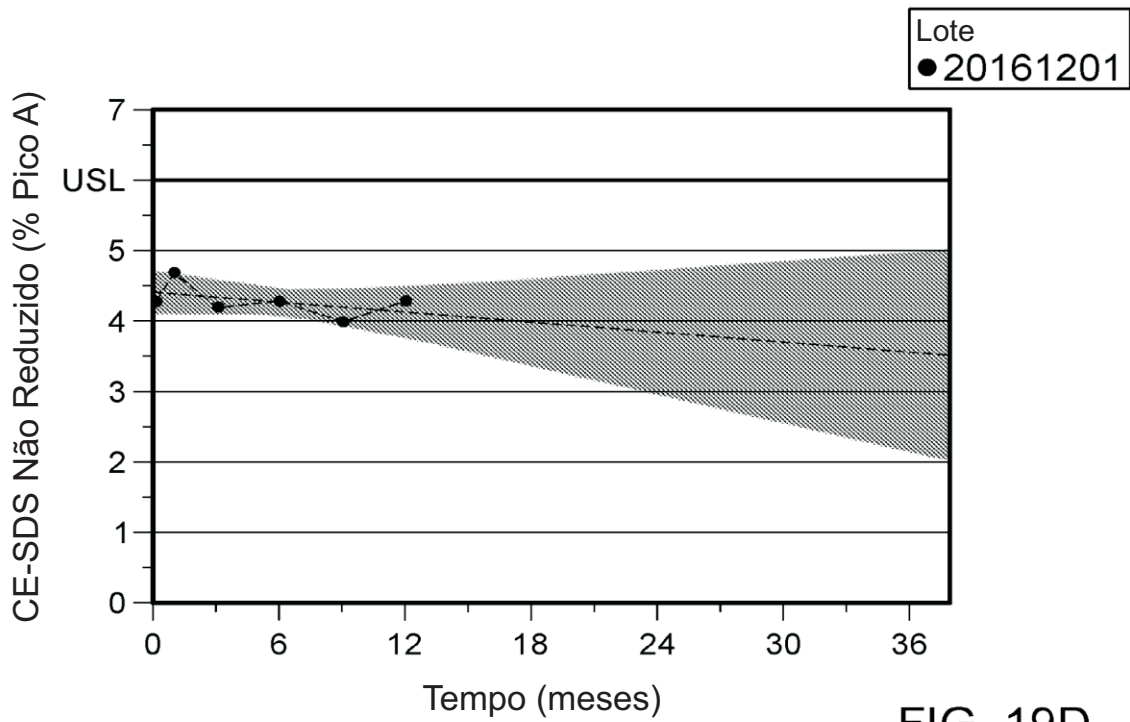
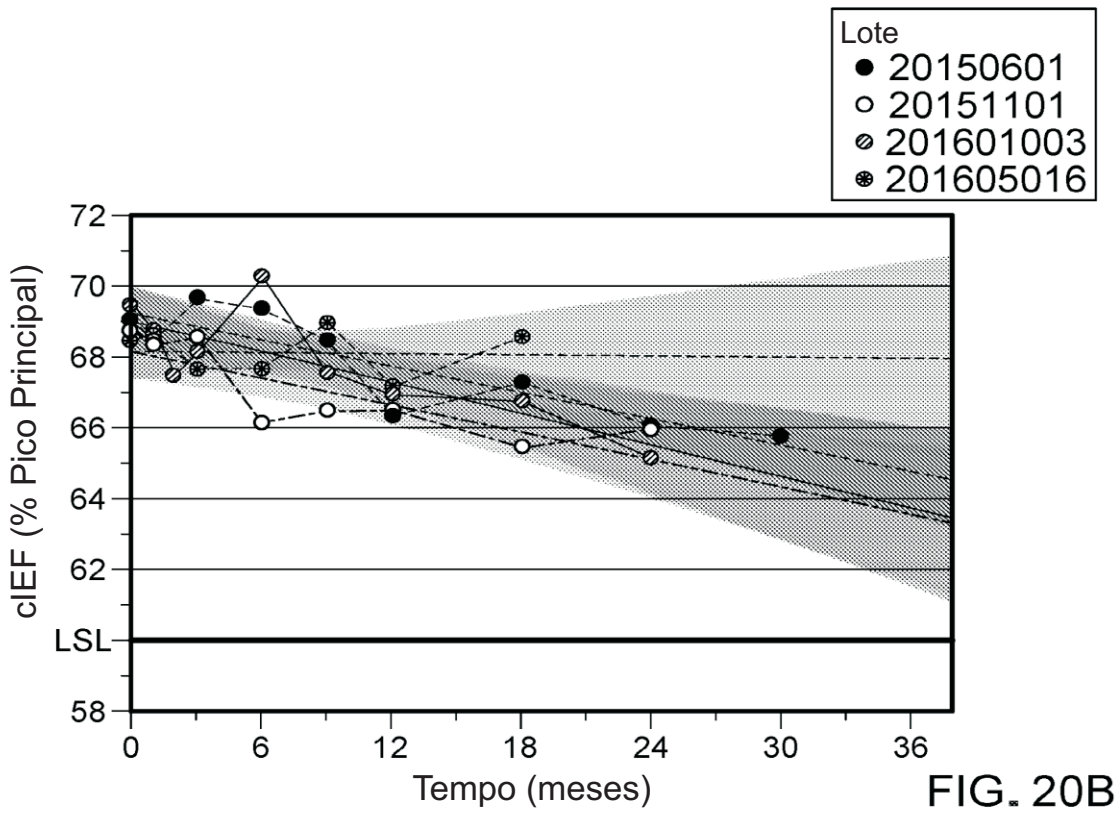
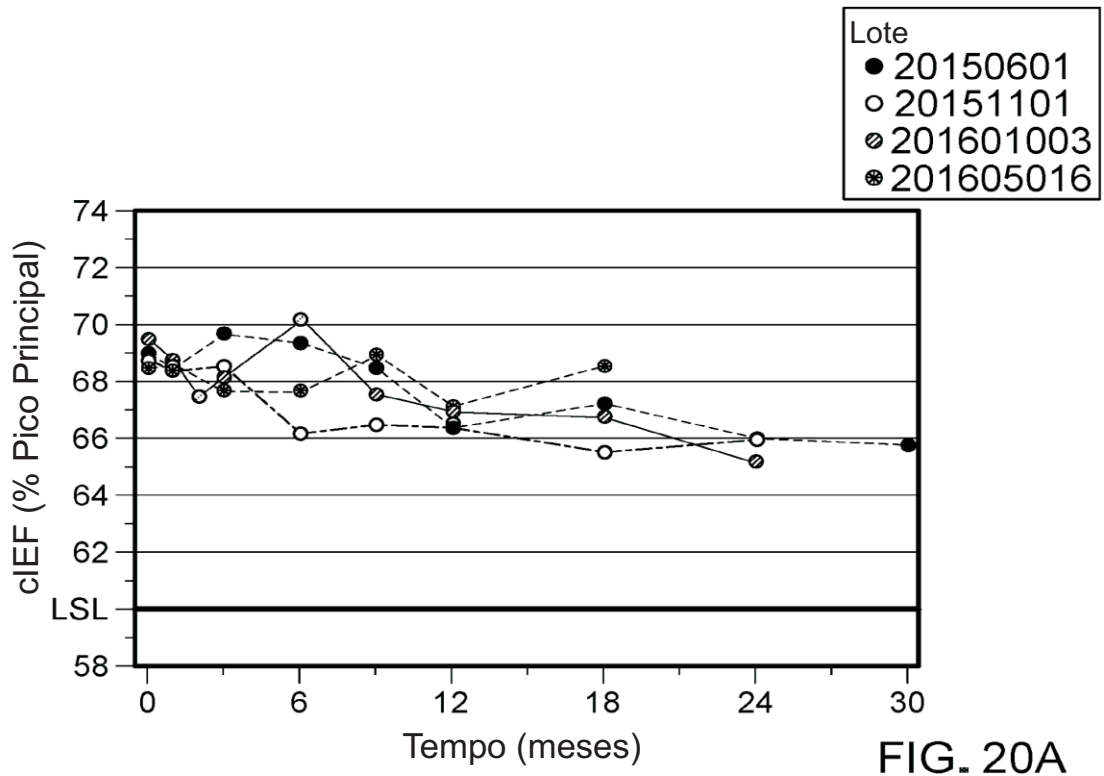


FIG. 19D



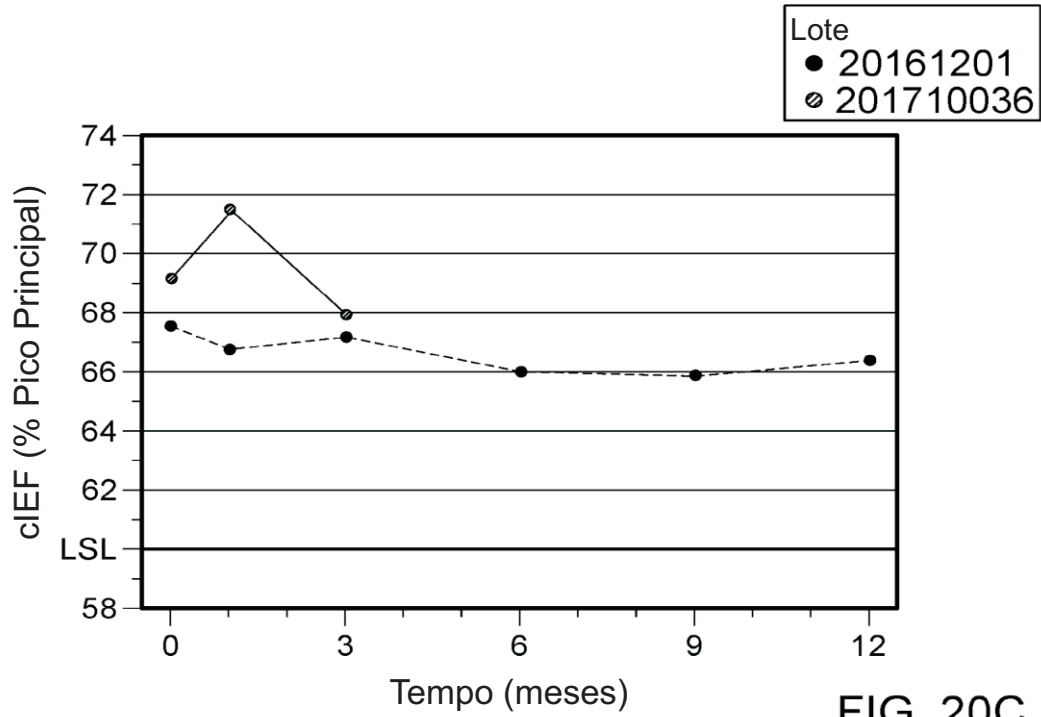


FIG. 20C

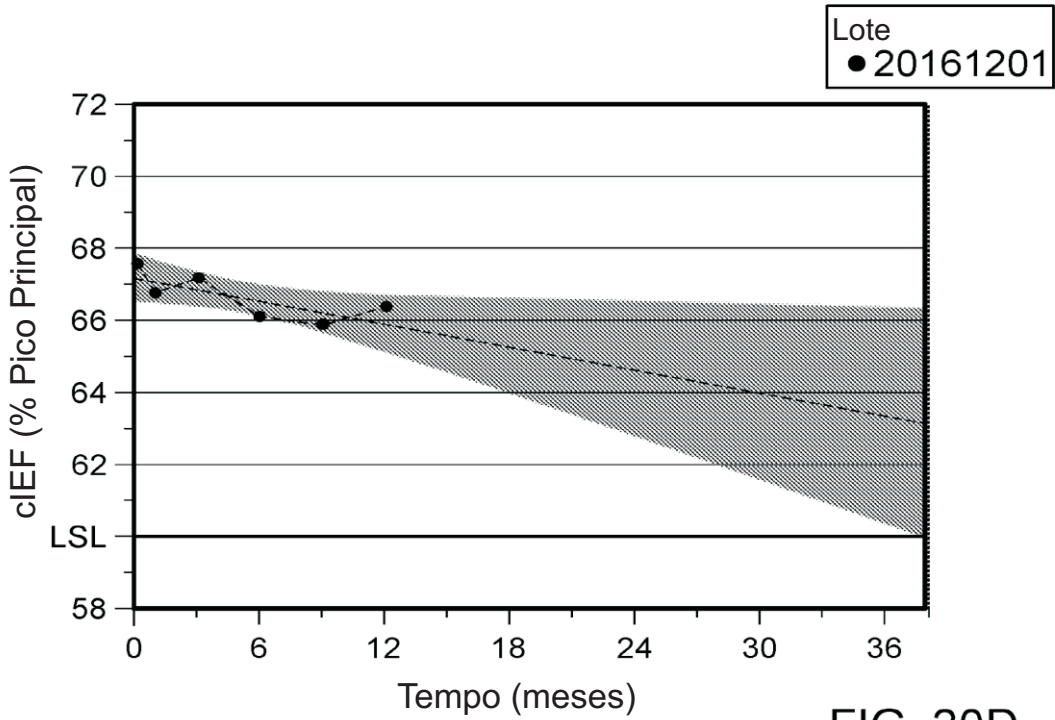
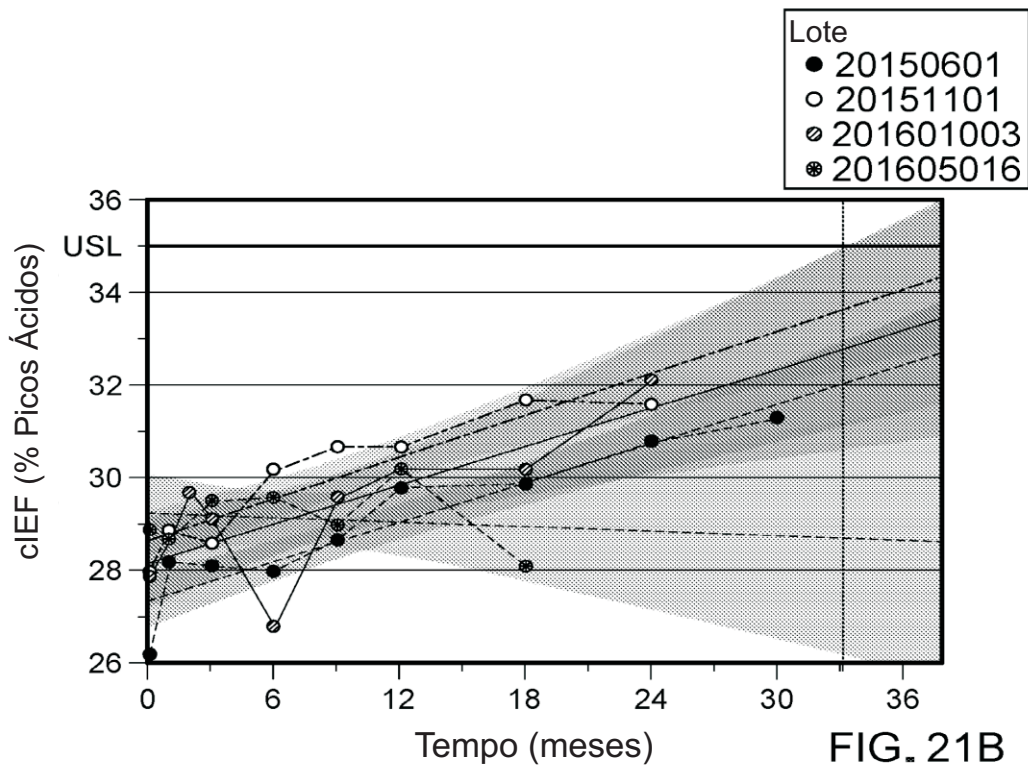
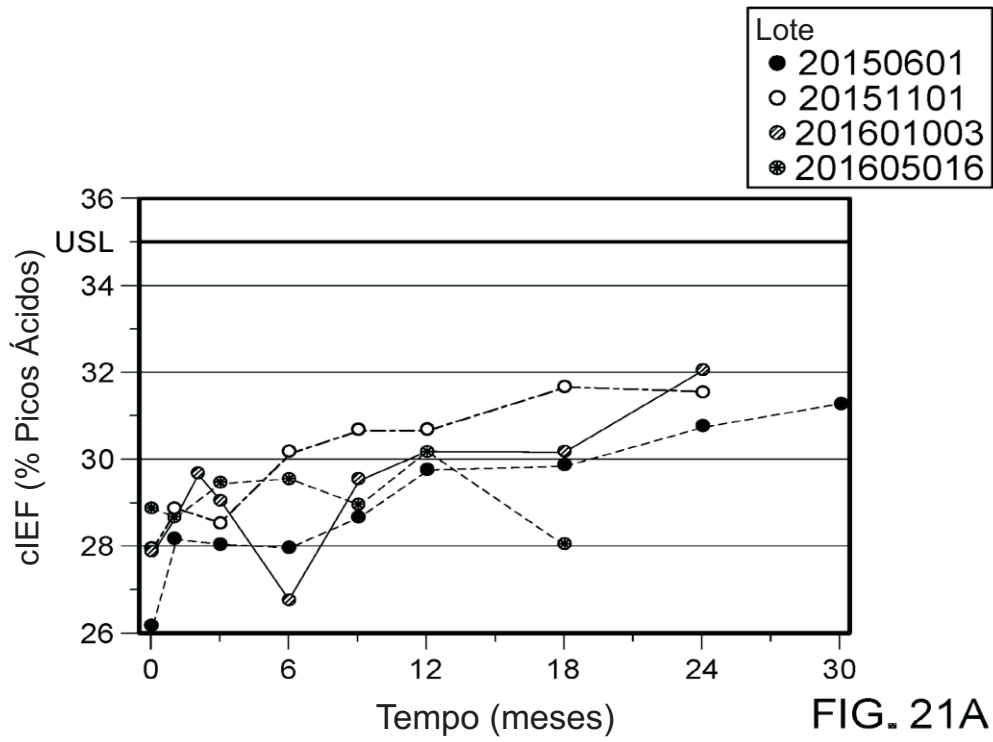


FIG. 20D



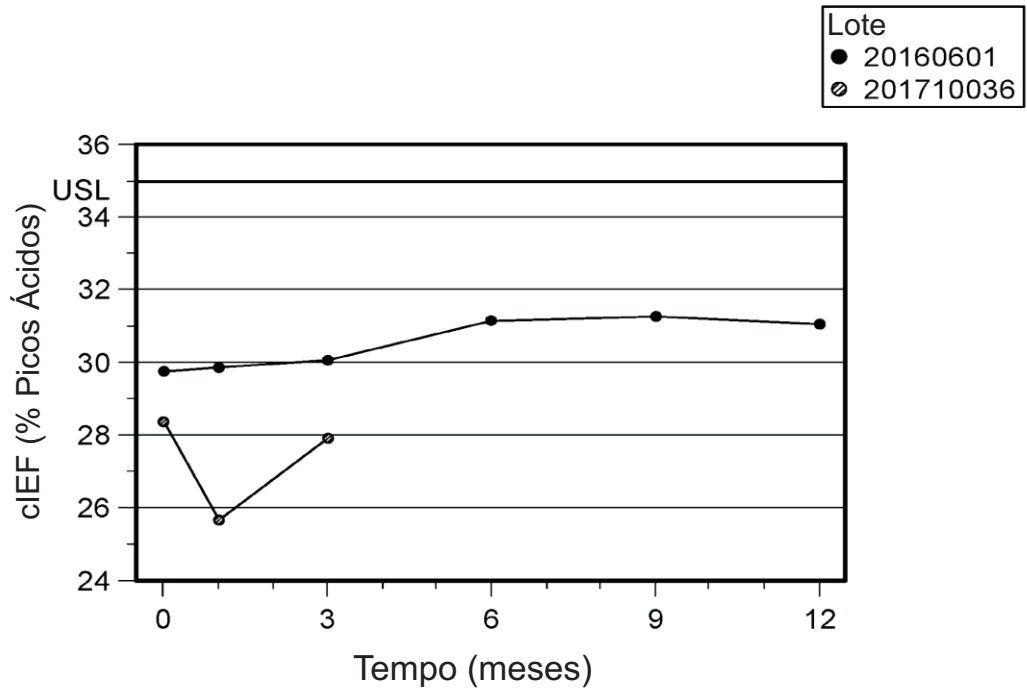


FIG. 21C

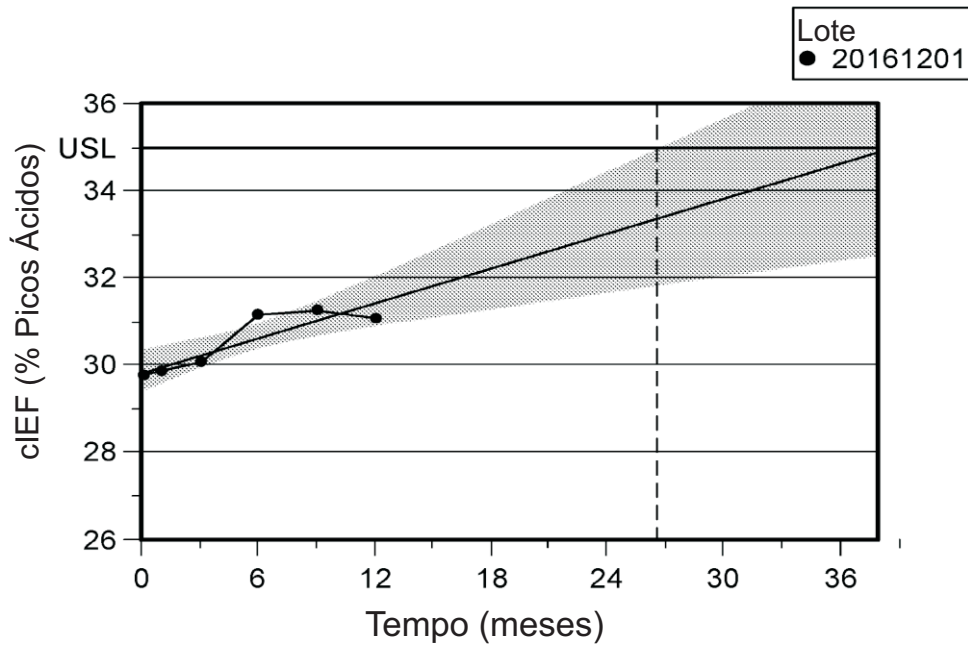


FIG. 21D

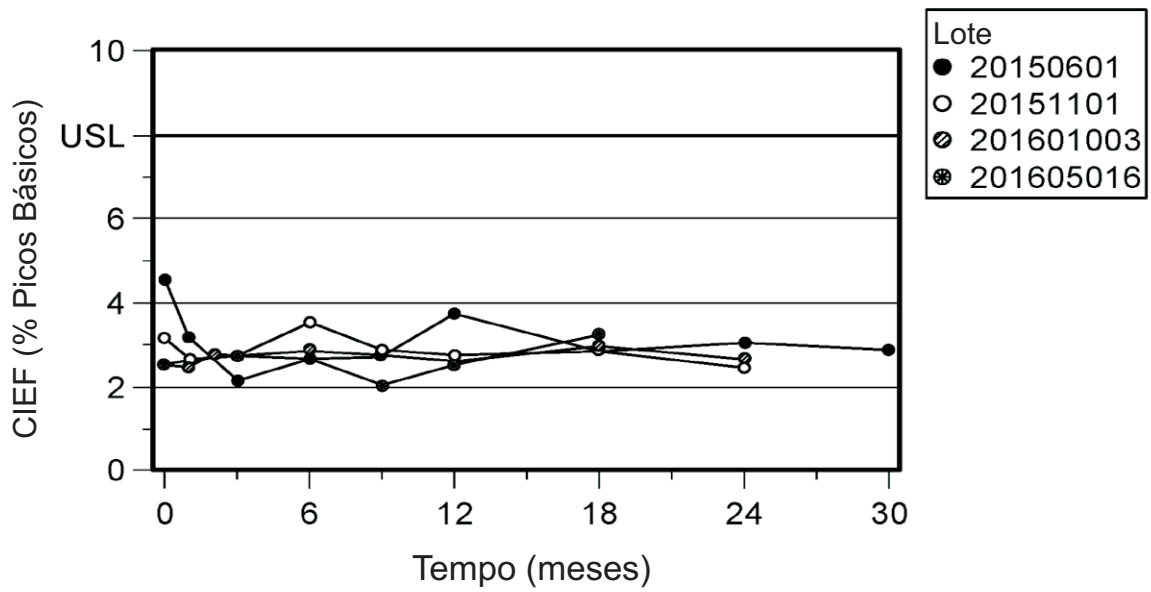


FIG. 22A

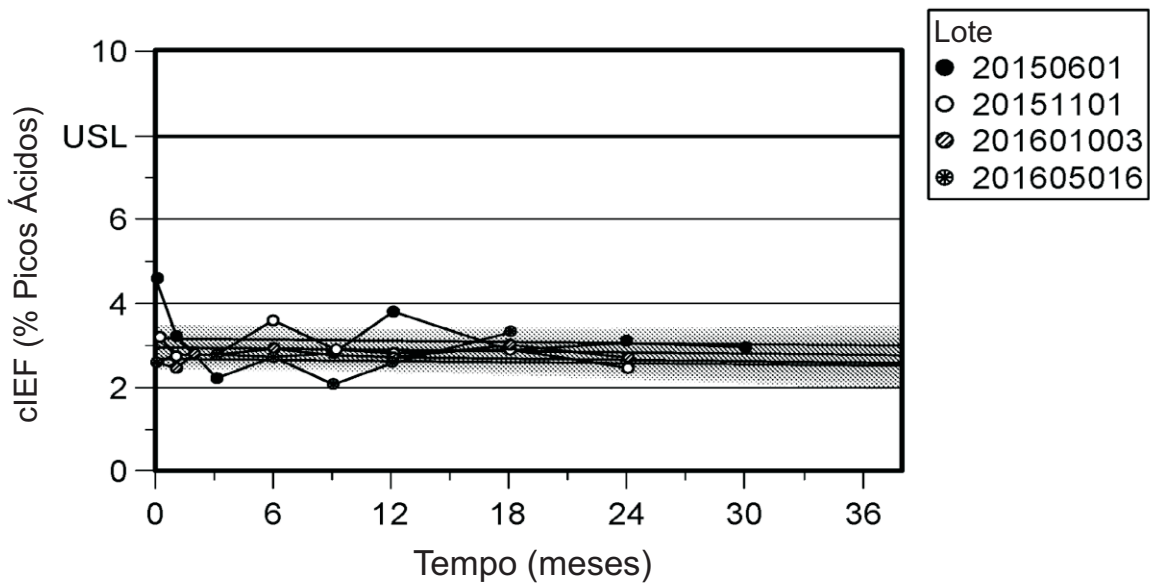


FIG. 22B

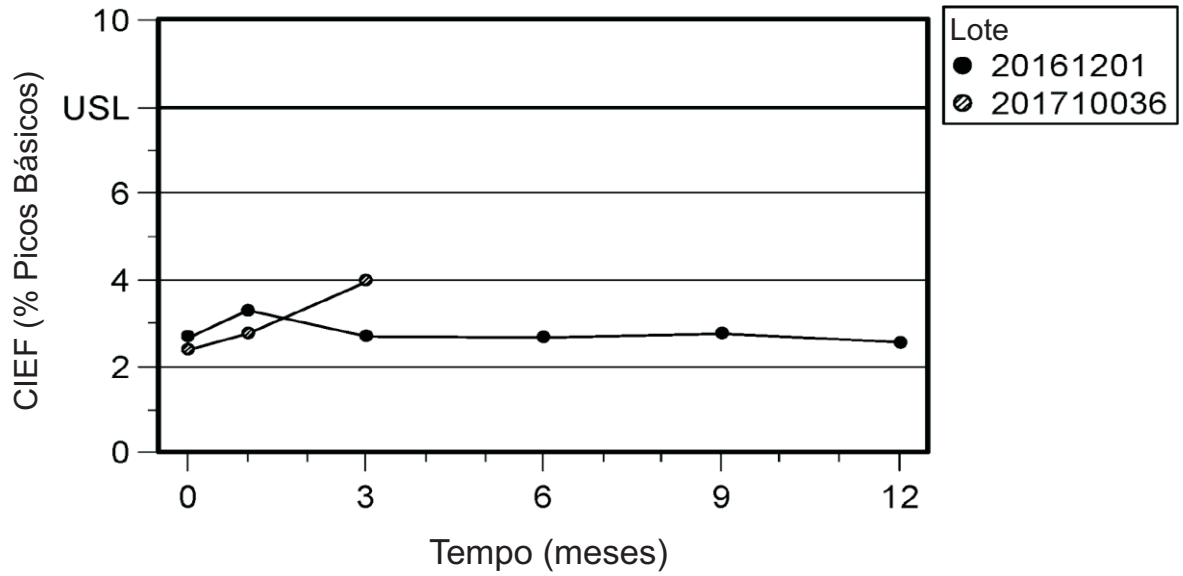


FIG. 22C

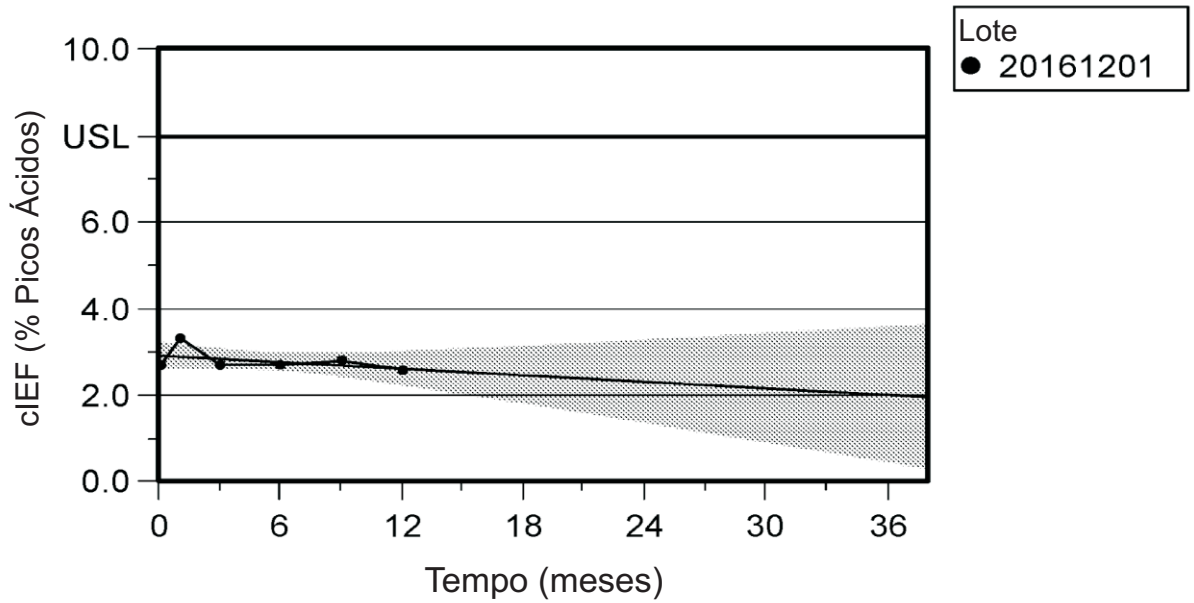


FIG. 22D

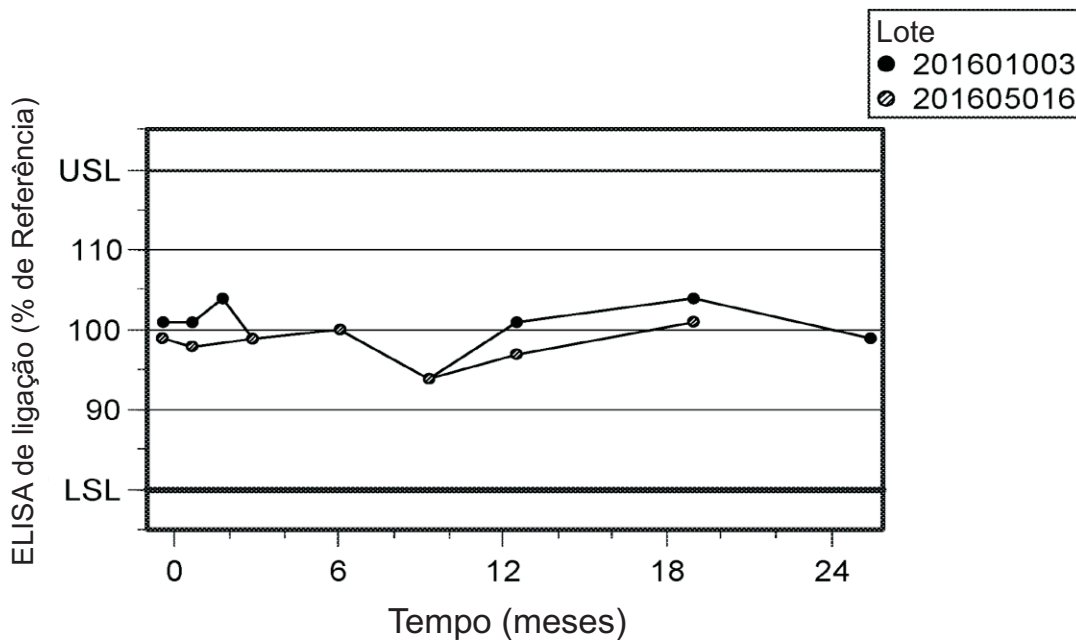


FIG. 23A

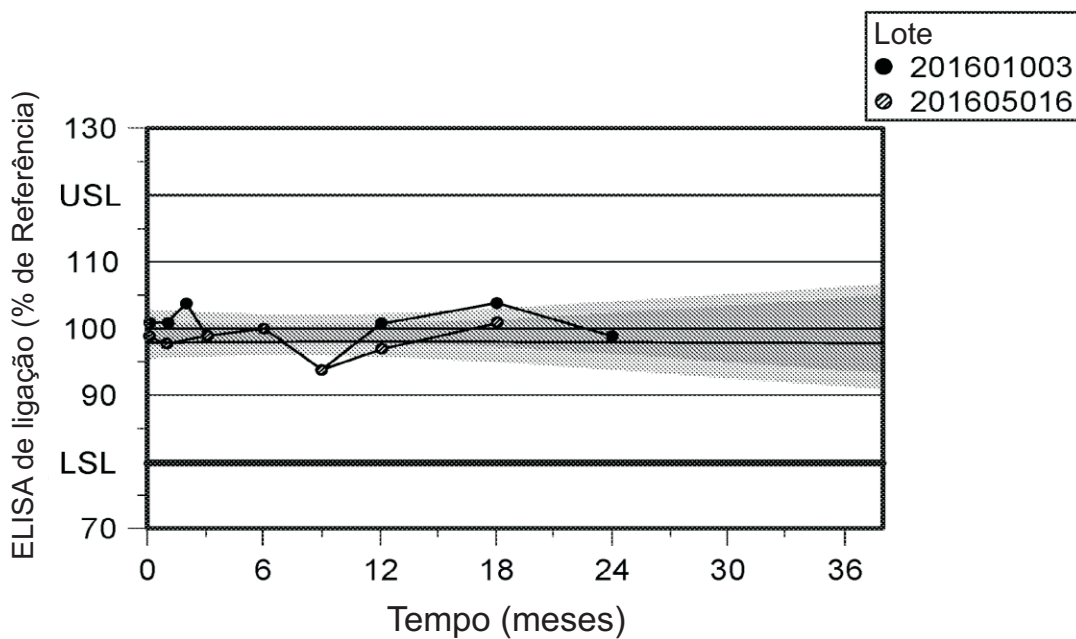


FIG. 23B

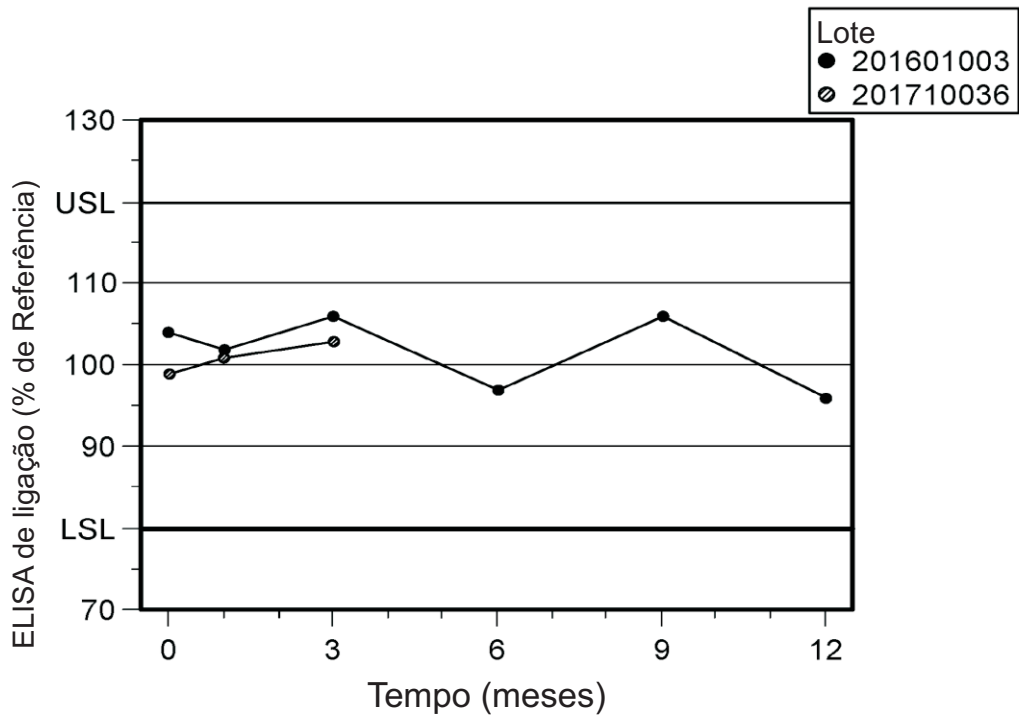


FIG. 23C

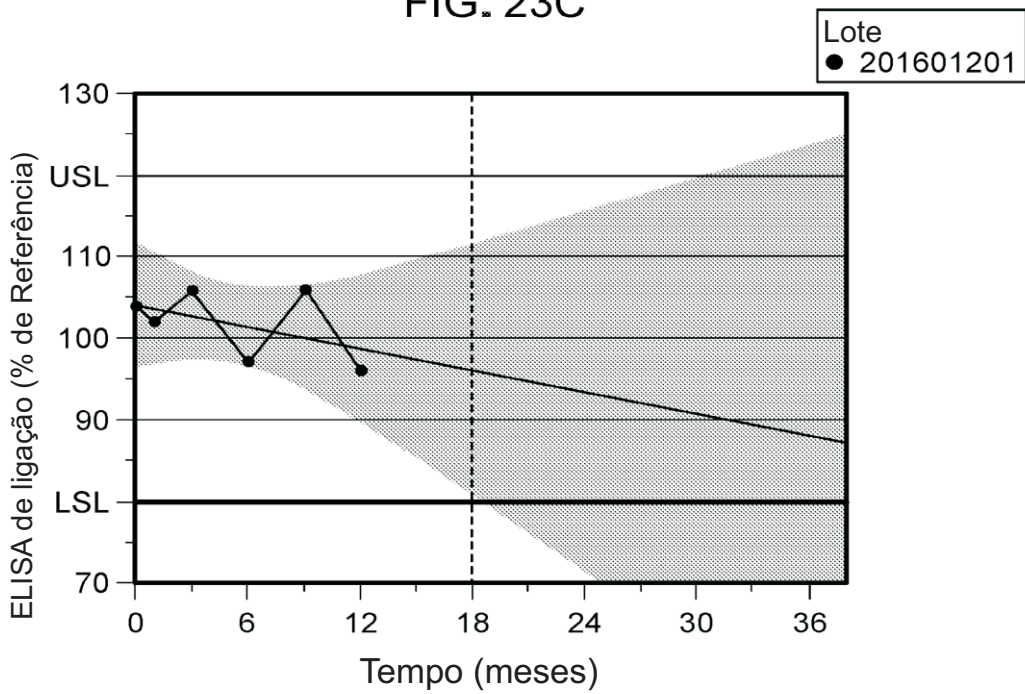


FIG. 23D

## **RESUMO**

Patente de Invenção: "**COMPOSIÇÕES DE ANTICORPOS FCRN E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS**".

A presente invenção refere-se a composições farmacêuticas estáveis contendo um anticorpo anti-FcRn que são descritas e caracterizadas.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

### Código de Controle

Campo 1



Campo 2



### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA 19.01.21 P251596.TXT
- Data de Geração do Código: 19/01/2021
- Hora de Geração do Código: 16:09:56
- Código de Controle:
  - Campo 1: 9D7EA416CC9D63B7
  - Campo 2: CFABC830936EF0BF