

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 895 180**

51 Int. Cl.:

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2018 PCT/US2018/059016**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2019 WO19182650**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2018 E 18816295 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.08.2021 EP 3768246**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas de saposina C y su uso en el tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:

23.03.2018 US 201862647058 P

31.05.2018 US 201862678668 P

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

17.02.2022

73 Titular/es:

**BEXION PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
632 Russell Street
Covington, Kentucky 41011, US**

72 Inventor/es:

**MONSON, ELLEN K.;
WEI, XIAOCHEN;
TAKIGIKU, RAY;
CRUZE, III, CHARLES A y
WYSE, JOSEPH W.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 895 180 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas de saposina C y su uso en el tratamiento de cáncer

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones que contienen saposina C y a dichas composiciones para su uso en procedimientos de tratamiento de diversas afecciones cancerosas.

10 Antecedentes

Las saposinas, una familia de glicoproteínas termoestables pequeñas (~80 aminoácidos), son esenciales para la actividad hidrolítica *in vivo* de varias enzimas lisosómicas en la vía catabólica de los glicoesfingolípidos. Las saposinas A, B, C y D se describen en las patentes de Estados Unidos N° 7.834.147 y 9.271.932.

15 Las nanovesículas que comprenden saposina C ("SapC") y dioleoil-fosfatidilserina (DOPS) tienen una alta afinidad por las membranas ricas en fosfatidilserina *in vitro* e *in vivo*, y pueden inducir apoptosis y necrosis en células diana (Qi et al. (2009), Clin Cancer Res 2009; 15: 5840-5851). El mecanismo propuesto mediante el cual las nanovesículas SapC-DOPS inducen la apoptosis es por medio de la elevación de ceramidas a través de la activación de β -glucosidasa y esfingomielinasa ácida (con la posterior degradación de glucosilceramida y esfingomielina, respectivamente), lo que da lugar a la activación de caspasas. Se ha descubierto que la preparación de nanovesículas es eficaz contra una amplia diversidad de tipos de tumores *in vitro* y en modelos de tumores murinos ortotópicos (Qi et al. (2009); Wojton et al. (2013), Mol Ther, 21: 1517-1525.; Abu-Baker et al. (2012), J Cancer Ther, 3: 321-326.; Chu et al. (2013), PLoS One; 8: e75507; patente de Estados Unidos N° 7.834.147). El documento WO2014078522 divulga nanovesículas que comprenden saposina C y dioleoilfosfatidilserina útiles para tratar cánceres tales como glioblastoma.

Sumario

30 La presente divulgación se refiere a composiciones acuosas y sólidas que comprenden saposina C y a procedimientos para el uso de dichas composiciones en el tratamiento de cáncer.

Se describe una composición que incluye: un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con de cero a cuatro inserciones, sustituciones o deleciones de aminoácidos; un lípido fosfatidilserina; un tampón a un pH de 5,0 a 8,0; trehalosa a del 1,5 al 9 por ciento p/p; alcohol t-butílico a del 0 al 35 por ciento; y agua. El polipéptido se encuentra a una concentración de 0,4 a 5,0 mg/ml y la relación molar de lípido fosfatidilserina con respecto al polipéptido se encuentra en el intervalo de 8:1 a 20:1. En algunas formas de realización, el tampón es tris(hidroximetil)aminometano (Tris) a una concentración de 10 a 50 mM, y el pH de la composición es de 6,8 a 7,6. En algunas formas de realización, el tampón es tampón de citrato a una concentración de 10 a 50 mM. En algunas formas de realización, el tampón es tampón de acetato a una concentración de 10 a 50 mM. En determinadas formas de realización, el lípido fosfatidilserina comprende uno o más de entre dioleoilfosfatidilserina (DOPS), lípido dihexanoilfosfatidilserina, lípido dioctanoilfosfatidilserina, lípido didecanoilfosfatidilserina, lípido dilauroilfosfatidilserina, lípido dimirostoilfosfatidilserina, lípido dipalmitoilfosfatidilserina, lípido palmitoil-oleoilfosfatidilserina, lípido 1-estearoil-2-oleoilfosfatidilserina o lípido difitanoilfosfatidilserina. El lípido fosfatidilserina es preferentemente DOPS, que puede encontrarse en forma de una sal, tal como una sal de sodio. En varios casos, el polipéptido incluye, o consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o la secuencia de SEQ ID NO: 1 con una o dos inserciones, sustituciones o deleciones de aminoácidos. En una forma de realización preferida, la composición incluye: un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, a una concentración de 1,9 a 2,5 mg/ml; DOPS a una concentración de 2,0 a 2,8 mg/ml; Tris a una concentración de 23 a 27 mM; trehalosa en una concentración del 4 al 6 por ciento p/p; y alcohol t-butílico a una concentración de aproximadamente el 15 al 25 por ciento p/p; con un pH en el intervalo de pH de 6,8 a 7,6.

También se describe una composición en forma sólida, por ejemplo, una composición en polvo liofilizado, que incluye: un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con de cero a cuatro inserciones, sustituciones o deleciones de aminoácidos; un lípido fosfatidilserina; un tampón; y trehalosa a del 75 al 90 por ciento p/p. El polipéptido se encuentra en esta composición a una concentración del 3,2 al 4,4 por ciento p/p, y la relación molar de lípido fosfatidilserina con respecto al polipéptido se encuentra en el intervalo de 8:1 a 20:1. En algunas formas de realización, el tampón es Tris a del 5,6 al 7,6 por ciento p/p. En algunas formas de realización, el tampón es tampón de citrato a del 9 al 13 por ciento p/p. En algunas formas de realización, el tampón es tampón de acetato a del 3 al 5 por ciento p/p. En determinadas formas de realización, el lípido fosfatidilserina incluye uno o más de entre dioleoilfosfatidilserina (DOPS), lípido dihexanoilfosfatidilserina, lípido dioctanoilfosfatidilserina, lípido didecanoilfosfatidilserina, lípido dilauroilfosfatidilserina, lípido dimirostoilfosfatidilserina, lípido dipalmitoilfosfatidilserina, lípido palmitoil-oleoilfosfatidilserina, lípido 1-estearoil-2-oleoilfosfatidilserina o lípido difitanoilfosfatidilserina. En varios casos, la composición incluye, o consiste en, la secuencia de aminoácidos polipeptídicos de SEQ ID NO: 1, o incluye la secuencia de SEQ ID NO: 1 con una o dos inserciones, sustituciones o deleciones de aminoácidos. En algunas formas de realización, esta composición incluye alcohol t-butílico en una cantidad inferior al 3 por ciento p/p. En una forma de realización preferida, la composición sólida incluye: un polipéptido

que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a una concentración del 3,3 al 4,3 por ciento p/p; DOPS (por ejemplo, la sal de sodio) a una concentración del 3,4 al 4,8 por ciento p/p; Tris a una concentración del 6,0 al 7,2 por ciento p/p; trehalosa a una concentración del 81 al 87,3 por ciento p/p; y alcohol t-butílico a una concentración inferior al 3 por ciento p/p.

5 También se describe una composición farmacéutica que incluye: un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con de cero a cuatro inserciones, sustituciones o deleciones de aminoácidos; un lípido fosfatidilserina; un tampón a un pH de 5,0 a 8; trehalosa a del 1,5 al 9 por ciento p/v; y agua. El polipéptido se encuentra en una concentración de 0,4 a 5 mg/ml y la relación molar de lípido fosfatidilserina con respecto a polipéptido se encuentra en el intervalo de 8:1 a 20:1. En algunas formas de realización, el tampón es Tris a una concentración de 10 a 50 mM y el pH de la composición es de 6,8 a 7,6. En algunas formas de realización, el tampón es tampón de citrato a una concentración de 10 a 50 mM. En algunas formas de realización, el tampón es tampón de acetato a una concentración de 10 a 50 mM. En determinadas formas de realización, el lípido fosfatidilserina comprende uno o más de DOPS, lípido dihexanoilfosfatidilserina, lípido dioctanoilfosfatidilserina, lípido didecanoilfosfatidilserina, lípido dilauroilfosfatidilserina, lípido dimirostoilfosfatidilserina, lípido dipalmitoilfosfatidilserina, lípido palmitoiloleoilfosfatidilserina, lípido 1-estearoil-2-oleoilfosfatidilserina o lípido difitanoilfosfatidilserina, y preferentemente es DOPS, por ejemplo, la sal sódica de DOPS. En varios casos, el polipéptido comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o comprende, o consiste en, la secuencia de SEC ID NO: 1 con una o dos inserciones, sustituciones o deleciones de aminoácidos. En algunas formas de realización, esta composición incluye alcohol t-butílico en una cantidad inferior al 3 por ciento. En una forma de realización preferida, la composición incluye: un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a una concentración de 1,9 a 2,5 mg/ml; DOPS (preferentemente en su forma de sal de sodio) a una concentración de 2,0 a 2,8 mg/ml; Tris a una concentración de 23 a 27 mM; trehalosa a una concentración del 4 al 6 por ciento p/p; alcohol t-butílico en una cantidad inferior al 0,5 por ciento p/p; con un pH en el intervalo de pH de 6,8 a 7,6 (más preferentemente un pH de 7,0 a 7,4, o un pH de 7,1 a 7,3). También se describe un procedimiento de tratamiento de cáncer, que puede ser un tumor sólido. Los ejemplos de cánceres que pueden tratarse con el procedimiento incluyen glioma, ependimoma y cáncer gastrointestinal tal como adenocarcinoma rectal. El procedimiento incluye administrar a un paciente humano con cáncer una composición farmacéutica descrita en el presente documento. En algunas formas de realización, el procedimiento incluye reconstituir la composición sólida descrita en el presente documento en agua o solución salina para producir una composición reconstituida y administrar por vía intravenosa una dosis de la composición reconstituida al paciente. En algunas formas de realización, la composición se administra por vía intravenosa a una dosis que varía de 0,4 mg/kg a 7 mg/kg de SapC, y la relación de SapC con respecto a DOPS en la composición se encuentra en el intervalo de 1:8 a 1:20. En otra forma de realización, la composición se administra por vía intravenosa a una dosis de 2,3-2,5 mg/kg de SapC, y la relación de SapC con respecto a DOPS en la composición se encuentra en el intervalo de 1:11 a 1:13. En algunas formas de realización, la composición se administra repetidamente al paciente durante al menos dos ciclos, de la forma siguiente:

Ciclo 1:

40 semana 1: una dosis en cada uno de los días 1-5;
 semana 2: 3 veces por semana en días alternos, por ejemplo, una dosis en cada uno de los días 8, 10 y 12;
 45 semanas 3 y 4: una dosis por semana (cada 7 (+/- 3) días);

Ciclo 2:

una dosis durante la semana 5; y
 50 cualquier ciclo posterior:
 una dosis 28 (+/- 3) días después de la dosis anterior más reciente.

Breve descripción de los dibujos

55 La figura 1 es un gráfico que representa los resultados del análisis DSC de la muestra 75312-F10.
 La figura 2 es un gráfico que representa los resultados del análisis CD de las muestras enumeradas en la tabla 2.
 60 La figura 3 es un gráfico que representa el porcentaje de hélice α y arrollamiento aleatorio estimado a partir del análisis CD de las muestras enumeradas en la tabla 2.
 La figura 4 es un gráfico que representa, para cada muestra enumerada en la tabla 4, el valor de densidad óptica a 310 nm.

65

- La figura 5 es un gráfico que representa las mediciones SE-HPLC de pureza de SapC en $t = 0$ y después de 10 días a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ para las muestras enumeradas en la tabla 4.
- 5 La figura 6 es un gráfico que representa las mediciones RP-HPLC de pureza de SapC en $t = 0$ y después de 10 días a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ para las muestras enumeradas en la tabla 4.
- La figura 7 es un gráfico que representa las mediciones IEX-HPLC de pureza de SapC en $t = 0$ y después de 10 días a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ para las muestras enumeradas en la tabla 4.
- 10 La figura 8 es un gráfico que representa la densidad óptica cuando se analiza a 310 nm para cada composición de la tabla 8 en $t = 0$ y después de 10 días a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- La figura 9 es un gráfico que representa las mediciones RP-HPLC de pureza de SapC de las composiciones de la tabla 8 en $t = 0$ y después de 10 días a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 15 La figura 10 es un gráfico que representa las mediciones SE-HPLC de pureza de SapC de las composiciones de la tabla 8 en $t = 0$ y después de 10 días a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- La figura 11 es un gráfico que representa las mediciones IEX-HPLC de pureza de SapC de las composiciones de la tabla 8 en $t = 0$ y después de 10 días a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 20 La figura 12 es un gráfico que representa el pH de cada muestra del ejemplo 4.
- La figura 13 es un gráfico que representa el contenido de proteína de cada muestra del ejemplo 4.
- 25 La figura 14 es un gráfico que representa las mediciones RP-HPLC de pureza de SapC y el porcentaje de recuperación en composiciones reconstituidas en $t = 0$ y después de un almacenamiento durante 2 semanas a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ para las muestras enumeradas en la tabla 14.
- 30 Las figuras 15A-B son gráficos que representan los resultados de la dispersión de luz dinámica para la muestra 76114-F5 en $t = 0$ (A) y después de 5 semanas (B) a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Las figuras 16A-B son gráficos que representan los resultados de la dispersión dinámica de la luz para la muestra 76114-F6 en $t = 0$ (A) y después de 5 semanas (B) a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 35 La figura 17 es un gráfico que representa los resultados de la dispersión dinámica de la luz para cada muestra reconstituida en $t = 0$ para las muestras enumeradas en la tabla 21.
- La figura 18 es un gráfico que representa el cambio en dispersión dinámica de la luz para cada muestra reconstituida a lo largo del tiempo para las muestras enumeradas en la tabla 21.
- 40 La figura 19 es un gráfico que representa el porcentaje de TBA en cada muestra reconstituida de las composiciones de la tabla 22.
- 45 La figura 20 es un gráfico que representa el porcentaje de TBA en cada muestra reconstituida de las composiciones de la tabla 23.
- Las figuras 21A-D son gráficos que muestran distribuciones de tamaño de partículas para tres réplicas de líquidos reconstituidos para algunas de las composiciones de la tabla 23.
- 50 La figura 22 es un gráfico que representa las mediciones RP-HPLC de pureza de SapC en cada composición reconstituida preparada a partir de polvo liofilizado que se había almacenado a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 o 4 semanas, para las muestras enumeradas en la tabla 26.
- 55 La figura 23 es un gráfico que representa las mediciones IEX-HPLC de pureza de SapC en cada composición reconstituida preparada a partir de polvo liofilizado que se había almacenado a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 o 4 semanas, para las muestras enumeradas en la tabla 26.
- La figura 24 es un gráfico que representa el tamaño de partícula promedio a lo largo del tiempo en cada composición reconstituida preparada a partir de polvo liofilizado que se había almacenado a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 o 4 semanas, para las muestras enumeradas en la tabla 26.
- 60 La figura 25 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo enzimático de GBA que analiza la actividad de SapC-DOPS.
- 65

La figura 26 es una tabla que muestra los datos demográficos y los eventos adversos de la fase 1a por grupo de dosificación.

5 Las figuras 27A-C son tres conjuntos de gráficos que ilustran los perfiles medios de concentración plasmática de SapC-tiempo tras la administración intravenosa de dosis múltiples de BXQ-350 durante 0,75 h cada 24 horas el día 1 (figura 27A), el día 4 (figura 27B) y el día 22 (figura 27C) en pacientes con tumores sólidos (log lineal).

10 Las figuras 28A-D son representaciones de resultados de histología *post-mortem* y análisis de anatomía macroscópica; de izquierda a derecha: (A) El espécimen quirúrgico inicial mostró poca evidencia de diferenciación endodermia y abundantes figuras mitóticas. H&E a 40x; (B) El examen macroscópico del cerebro en la autopsia mostró una amplia necrosis tumoral; (C) El examen microscópico de secciones de tumor muestra poco tumor viable y necrosis (H&E a 4x con inserto a 40x); (D) En la autopsia hubo una amplia diferenciación condroide en el sitio en el que el tumor se extendía a través del defecto quirúrgico y el cuero cabelludo.

15 La figura 29 es un gráfico *swimmer plot* que ilustra los resultados de los pacientes en un ensayo clínico de fase 1A.

Las figuras 30A y 30B son un par de imágenes de tomografía por emisión de positrones (PET) al inicio del tratamiento (figura 30A) y después de más de 12 meses de tratamiento (figura 30B).

20 Descripción detallada

La presente invención se refiere a composiciones que también se utilizan en un procedimiento de tratamiento de cáncer, tal como tumores sólidos, incluidos cánceres de cerebro. Las composiciones incluyen un polipéptido de saposina, tal como saposina C (SapC), y una fosfatidilserina o un análogo estructural de la misma, por ejemplo dioleoilfosfatidilserina (DOPS).

25 Los términos "aminoácido" o "secuencia de aminoácidos", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a un oligopéptido, péptido, polipéptido o secuencia proteica, o un fragmento de cualquiera de los mismos, y a moléculas de origen natural o sintéticas. Cuando se menciona en el presente documento "secuencia de aminoácidos" para referirse a una secuencia de aminoácidos de una molécula proteica de origen natural, "secuencia de aminoácidos" y términos similares no pretenden limitar la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos nativa completa asociada con la molécula proteica mencionada.

35 Una "delección", tal como se utiliza el término en el presente documento, se refiere a un cambio en la secuencia de aminoácidos o nucleótidos que da como resultado la ausencia de uno o más residuos de aminoácidos o nucleótidos.

40 Las palabras "inserción" o "adición", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a cambios en una secuencia de aminoácidos o nucleótidos que dan como resultado la adición de uno o más residuos de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente, a la secuencia que se encuentra en la molécula de origen natural.

45 El término "proteína fusogénica o polipéptido fusogénico", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína o un péptido que cuando se añade a dos membranas bicapa separadas puede provocar su fusión en una sola membrana. La proteína fusogénica fuerza a las membranas de la célula o del modelo a entrar en contacto estrecho y hace que se fusionen. Las proteínas y los polipéptidos fusogénicos lisosómicos adecuados para su uso en la presente invención incluyen proteínas de la familia de las saposinas.

50 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "saposina" se refiere a la familia de proteínas y polipéptidos derivados de prosaposina, incluidas las saposinas A, B, C y D de origen natural (de seres humanos u otras especies animales tales como ratón, rata, cerdo y vaca; véase, por ejemplo, Qi et al. (1996) J. Biol. Chem. 271 (12): 6874-6880), así como proteínas y péptidos sintéticos derivados de saposina y análogos de péptidos que muestran actividad fusogénica. En determinadas formas de realización, el polipéptido de saposina comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SapC humana: Ser Asp Val Tyr Cys Glu Val Cys Glu Phe Leu Val Lys Glu Val Thr Lys Leu Ile Asp Asn Asn Lys Thr Glu Lys Glu Ile Leu Asp Ala Phe Asp Lys Met Cys Ser Lys Leu Pro Lys Ser Leu Ser Glu Glu Cys Gln Glu Val Val Asp Thr Tyr Gly Ser Ser Ile Leu Ser Ile Leu Leu Glu Glu Val Ser Pro Glu Leu Val Cys Ser Met Leu His Leu Cys Ser Gly (SEQ ID NO: 1). En otras formas de realización, el polipéptido SapC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con de cero a cuatro inserciones, sustituciones o delecciones de aminoácidos, por ejemplo, un total de uno, dos, tres o cuatro de dichos cambios. En algunas formas de realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido SapC comprende la SEQ ID NO: 1 con una o dos inserciones, sustituciones o delecciones de aminoácidos, o una combinación de dichos cambios. También se incluyen los análogos de polipéptidos que poseen algún grado de actividad fusogénica de SapC humana. Por "análogo" se entiende un polipéptido con sustituciones u otras alteraciones en la secuencia de aminoácidos de SapC, sustituciones o alteraciones que no afectan negativamente a las propiedades fusogénicas del polipéptido. Por lo tanto, un análogo podría ser un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a SEQ ID NO: 1 y en la que uno o más residuos de aminoácidos se hayan sustituido de forma conservadora por aminoácidos químicamente similares. Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un residuo no polar (hidrófobo) tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro. Asimismo, la presente invención contempla la sustitución de un residuo polar (hidrófilo)

tal como entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, y entre glicina y serina. También se contempla la sustitución de un residuo básico tal como lisina, arginina o histidina por otro o la sustitución de un residuo ácido tal como ácido aspártico o ácido glutámico por otro.

5 La SapC y los polipéptidos derivados de la misma pueden producirse mediante cualquier procedimiento útil, tal como, por ejemplo, químicamente, enzimáticamente o de forma recombinante. Los procedimientos para producir polipéptidos y fragmentos de los mismos son conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, síntesis química de péptidos, sistemas de traducción *in vitro* y expresión (y purificación de) un organismo huésped recombinante.

10 "Vesícula lipídica" y "liposoma" se usan indistintamente para referirse a un grupo o agregado generalmente esférico de lípidos anfipáticos, típicamente en forma de una o más capas concéntricas, por ejemplo, bicapas.

Los términos "fosfatidilserina" y "lípidos fosfatidilserina" se usan indistintamente para referirse a lípidos que tienen dos ácidos grasos unidos en un enlace éster al primer y al segundo carbono del glicerol y un resto serina unido a través de un enlace fosfodiéster al tercer carbono del glicerol. Los ejemplos de lípidos fosfatidilserina que pueden usarse con las presentes composiciones incluyen los siguientes: lípidos dioleoilfosfatidilserina (DOPS); lípidos dihexanoilfosfatidilserina, lípidos dioctanoilfosfatidilserina, lípidos didecanoilfosfatidilserina, lípidos dilauroilfosfatidilserina, lípidos dimirostoilfosfatidilserina, lípidos dipalmitoilfosfatidilserina, lípidos palmitoil-oleoilfosfatidilserina, lípidos 1-estearoil-2-oleoilfosfatidilserina o lípidos difitanoilfosfatidilserina, prefiriéndose DOPS. En composiciones acuosas a pH neutro, dichos lípidos fosfatidilserina están presentes típicamente en forma de una sal con un catión, por lo que las referencias a DOPS y otros lípidos fosfatidilserina utilizados en las presentes composiciones pretenden incluir tanto la forma salina como la forma no salina de los lípidos. Los cationes adecuados incluyen cualquier catión farmacéuticamente aceptable que forme una sal con el lípidos fosfatidilserina, tal como cualquiera de los siguientes: ion amonio; ion L-arginina; ion benzatina; ion deanol; ion dietanolamina (2,2'-iminodietanol); ion hidrabamina; ion lisina; ion potasio; ion sodio; ion trietanolamina (2,2',2''-nitrilotri(etan-1-ol)); y ion trometamina (2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol). Las sales de sodio, potasio y amonio son las preferidas.

Las composiciones de la presente invención pueden contener agentes tampón. Los ejemplos de agentes tampón incluyen acetato, citrato, histidina, succinato y tris(hidroximetil)aminometano (Tris; también conocido como trometamina), así como derivados conocidos de Tris, tales como aquellos en los que el grupo amino está modificado. En una forma de realización preferida, las presentes composiciones acuosas contienen Tris en una concentración de 10 a 50 mM (preferentemente de 20 a 30 mM, por ejemplo, 25 mM), y el pH de estas composiciones varía de un pH de 6,8 a un pH de 7,6 (por ejemplo un pH de 7 a 7,4, por ejemplo un pH de 7,1 a 7,3). En algunas formas de realización, las composiciones contienen tampón de citrato o tampón de acetato a una concentración de 10 a 50 mM, y el pH de las composiciones varía de 5,0 a 8,0.

Los polímeros biocompatibles útiles como materiales estabilizantes y/o agentes de volumen pueden ser de origen natural, semisintético (natural modificado) o sintético. Tal como se utiliza en el presente documento, el término polímero denota un compuesto que está compuesto por dos o más unidades monoméricas de repetición, y preferentemente 10 o más unidades monoméricas de repetición. El término polímero semisintético (o polímero natural modificado), tal como se emplea en el presente documento, denota un polímero natural que se ha modificado químicamente de alguna forma. Los ejemplos de polímeros naturales adecuados para su uso en la presente invención incluyen polisacáridos de origen natural. Dichos polisacáridos incluyen, por ejemplo, arabinanos, fructanos, fucanos, galactanos, galacturonanos, glucanos, mananos, xilanos (tales como inulina), levano, fucoidano, carragenano, galatocarolosa, ácido péctico, pectina, amilosa, pululano, glucógeno, amilopectina, celulosa, dextrano, dextrina, dextrosa, polidextrosa, pustulano, quitina, agarosa, queratano, condroitano, dermatano, ácido hialurónico, ácido algínico, goma xantana, almidón y otros diversos homopolímeros o heteropolímeros naturales, tales como los que contienen uno o más de las aldosas, las cetosas, los ácidos o las aminas siguientes: eritrosa, treosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, lucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa, eritrolulosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, fructosa, sorbosa, tagatosa, manitol, sorbitol, lactosa, sacarosa, trehalosa, maltosa, celobiosa, glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, ácido glucurónico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido galacturónico, ácido manurónico, glucosamina, galactosamina y ácido neuramínico, y derivados naturales de los mismos. Los ejemplos de polímeros semisintéticos incluyen carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa y metoxicelulosa. Los ejemplos de polímeros sintéticos adecuados para su uso en la presente invención incluyen polietilenos (como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polioxietileno y poli(tereftalato de etileno)), polipropilenos (tales como, por ejemplo, polipropilenglicol), poliuretanos (tales como, para ejemplo, poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(cloruro de vinilo) y polivinilpirrolidona (PVP)), poliamidas que incluyen nailon, poliestireno, ácidos polilácticos, hidrocarburos fluorados, carbonos fluorados (tales como politetrafluoroetileno) y polimetilmetacrilato, y derivados de cualquiera de los mismos. Los procedimientos de preparación de composiciones de vesículas que emplean polímeros como compuestos estabilizantes serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica, una vez armados con la presente divulgación, cuando la presente divulgación se combine con información conocida en la técnica, tal como la descrita y mencionada en la patente de Estados Unidos N° 5.205.290. De forma preferida, las presentes composiciones contienen uno o más de manitol, lactosa, trehalosa, sacarosa, PEG, PVP, sorbitol o glucosa.

65

Está disponible una amplia variedad de técnicas para la preparación de las composiciones reivindicadas. En una forma de realización preferida, DOPS u otro lípido fosfatidilserina se solubiliza con un disolvente orgánico y después se combina con los ingredientes de base acuosa, incluida la SapC, a temperatura ambiente durante 5-15 minutos. Los ejemplos de disolventes orgánicos que pueden utilizarse para este propósito incluyen etanol, DMSO, n-butanol y t-butanol (también conocido como alcohol t-butílico, TBA). En una forma de realización preferida, el disolvente orgánico es t-butanol, por ejemplo, con una pureza superior al 98%. Cuando se mezclan los ingredientes, el lípido y la SapC juntos forman vesículas suspendidas en la solución acuosa. La liofilización de la mezcla elimina no solo el agua, sino también la mayor parte o la totalidad del disolvente orgánico. En formas de realización preferidas, el polvo liofilizado contiene menos del 3% p/p de TBA.

Pueden utilizarse una amplia diversidad de técnicas conocidas por los expertos en la técnica para preparar composiciones de liposomas. Estas técnicas incluyen, por ejemplo, diálisis de disolvente, prensa francesa, extrusión (con o sin congelación-descongelación), evaporación en fase inversa, congelación-descongelación simple, sonicación, diálisis de quelato, homogeneización, infusión de disolvente, microemulsificación, formación espontánea, vaporización de disolvente, diálisis de disolvente, diálisis controlada con detergente, etc. Véase, por ejemplo, Madden et al., *Chemistry and Physics of Lipids*, 1990 53, 37-46. Técnicas de congelación-descongelación adecuadas se describen, por ejemplo, en la solicitud internacional con el número de serie PCT/US89/05040, presentada el 8 de noviembre de 1989. La preparación de los liposomas se puede llevar a cabo en una solución, tal como una solución salina acuosa, una solución de tampón de fosfato acuosa o agua estéril. Los liposomas se pueden preparar mediante varios procesos que implican agitación o agitación en vórtice.

Muchas técnicas de preparación de liposomas que pueden adaptarse para su uso en la preparación de composiciones de vesículas se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos Nº 4.728.578; la solicitud de patente del Reino Unido GB 2193095 A; las patentes de Estados Unidos Nº 4.728.575; 4.737.323; la solicitud internacional con el número de serie PCT/US85/01161; Mayer et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 858, páginas 161-168 (1986); Hope et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 812, páginas 55-65 (1985); Mayhew et al., *Methods in Enzymology*, Vol. 149, páginas 64-77 (1987); Mayhew et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 755, páginas 169-74 (1984); Cheng et al., *Investigative Radiology*, Vol. 22, páginas 47-55 (1987); la solicitud internacional con el número de serie PCT/US89/05040; las patentes de Estados Unidos Nº 4.533.254, 4.162.282, 4.310.505, 4.921.706; y *Liposome Technology*, Gregoriadis, G., ed., Vol. 1, páginas 29-31, 51-67 y 79-108 (CRC Press Inc., Boca Raton, Fla. 1984).

Como reconocerán los expertos en la técnica, cualquiera de las composiciones de vesículas puede liofilizarse para su almacenamiento y reconstituirse, por ejemplo, con un medio acuoso estéril adecuado para la administración a un paciente (tal como agua, solución tamponada con fosfato, solución tamponada con Tris o solución salina acuosa), si es necesario utilizando agitación vigorosa. Los liposomas pueden liofilizarse según procedimientos conocidos en la técnica, incluidos los descritos por Rey, L. (2010), *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*. ISBN 9781439825754. Los ejemplos de procedimientos de liofilización utilizan fases de congelación, secado primario y secado secundario según los parámetros descritos en la tabla I.

Tabla I. Intervalos de ejemplo de parámetros de liofilización

Etapa de ciclo	Temperatura, C	Presión, mTorr	Duración, minutos
Congelación	-40 a -50 (no superior a -40)	-	340 - 960
Secado primario	-15 hasta -25	30 - 65	2200 - 4300
Secado secundario	25 hasta 35	35 - 65	500 - 2300
Ciclo total	-	-	3040 - 7560

Para evitar la aglutinación o fusión de los lípidos y/o vesículas como resultado de la liofilización, puede ser útil incluir aditivos que eviten que se produzca dicha fusión o aglutinación. Los aditivos que pueden ser útiles incluyen sorbitol, manitol, cloruro de sodio, glucosa, trehalosa, polivinilpirrolidona (PVP) y polietilenglicol (PEG), por ejemplo, PEG 400. Estos y otros aditivos se describen en la literatura, tal como en la Farmacopea de los Estados Unidos, USP XXII, NF XVII, la Farmacopea de Estados Unidos, The National Formulary, United States Pharmacopeial Convention Inc., 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, Md.20852.

Los términos "estables" y "estabilizadas", aplicados a las vesículas, significan que las vesículas son sustancialmente resistentes a la degradación, incluida, por ejemplo, la pérdida de la estructura de la vesícula o gas encapsulado o precursor gaseoso, durante un periodo de tiempo útil. Los términos "estables" y "estabilizadas" aplicados a las presentes composiciones acuosas que contienen SapC/vesículas lipídicas (antes de la liofilización o después de la reconstitución del polvo liofilizado) significan que no hay una pérdida significativa de contenido o pureza de proteína o de lípido fosfatidilserina ni cambios significativos en las propiedades físicas. Los términos "estables" y "estabilizadas" aplicados a las presentes composiciones en polvo liofilizado significan que, tras la reconstitución con agua para inyección, no hay pérdida significativa de contenido o pureza de proteína y lípido fosfatidilserina ni cambios significativos en las propiedades físicas.

Los cánceres que se pueden tratar con las presentes composiciones incluyen, por ejemplo, cualquier tumor sólido o cáncer neurológico, por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, carcinoma de células renales, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer testicular, ependimoma, cánceres de cerebro tales como gliomas de alto grado (HGG), incluido glioblastoma multiforme (GBM), y cánceres gastrointestinales (GI), incluidos cáncer apendicular y cáncer colorrectal. Las composiciones son útiles para tratar tumores metastásicos independientemente del tipo de tumor primario o del órgano en el que se metastatiza. Un tumor metastásico puede surgir de una pluralidad de tipos de tumores primarios, incluidos, pero sin limitación, los de próstata, colon, pulmón, mama e hígado. Los términos "cáncer" y "neoplasia" pueden incluir neoplasias malignas de los diversos sistemas de órganos, tales como las que afectan a pulmones, mamas, tiroides, linfoides, aparato gastrointestinal o genitourinario, así como adenocarcinomas que incluyen neoplasias tales como la mayor parte de cánceres de colon, carcinoma de células renales, cáncer de próstata y/o tumores testiculares, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer de intestino delgado y cáncer de esófago. El término "carcinoma" es reconocido en la técnica y se refiere a neoplasias de tejidos epiteliales o endocrinos que incluyen carcinomas del sistema respiratorio, carcinomas del sistema gastrointestinal, carcinomas del sistema genitourinario, carcinomas testiculares, carcinomas de mama, carcinomas prostáticos, carcinomas del sistema endocrino y melanomas. Los ejemplos de carcinomas incluyen los que se forman a partir de tejido del cuello uterino, pulmón, próstata, mama, cabeza y cuello, colon y ovario. El término también incluye carcinosarcomas, que incluyen tumores malignos compuestos por tejidos carcinomatosos y sarcomatosos. Un "adenocarcinoma" se refiere a un carcinoma derivado de tejido glandular o en el que las células tumorales forman estructuras glandulares reconocibles. Se pueden encontrar más detalles en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 7.834.147.

"Paciente" o "sujeto" se refiere a un animal, incluido un mamífero, preferentemente un ser humano.

Una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz de la composición es una cantidad útil para tratar el cáncer de un paciente. En general, una única dosis terapéuticamente eficaz de la presente composición contendrá una cantidad de SapC (o su derivado) en el intervalo de aproximadamente 0,01 a 30 mg/kg de peso corporal, preferentemente de aproximadamente 0,05 a 20 mg/kg de peso corporal, de forma más preferida de aproximadamente 0,1 a 15 mg/kg de peso corporal, y de forma incluso más preferida de aproximadamente 0,5 a 10 mg/kg. Por ejemplo, la cantidad de SapC en una sola dosis intravenosa puede ser de aproximadamente 0,7 mg/kg, 1,1 mg/kg, 1,4 mg/kg, 1,8 mg/kg, 2,4 mg/kg, 2,8 mg/kg, 3,0 mg/kg, 3,2 mg/kg, 3,6 mg/kg o superior. Un paciente dado puede recibir un nivel de dosis dado para una o más administraciones iniciales y un nivel diferente (más bajo o más alto) para administraciones adicionales. La administración puede ser por cualquier vía inyectable adecuada, por ejemplo, intravenosa, intraarterial, intradérmica, intramuscular, intracardiaca, intracraneal, subcutánea o intraperitoneal. Normalmente, la composición de la invención se reconstituye en agua estéril para inyección y se administra mediante infusión intravenosa en una bolsa IV que contiene un vehículo isotónico, tal como solución salina, PBS o dextrosa al 5% en peso (D5W). Se pueden encontrar más detalles sobre las vías de administración, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 7.834.147.

La administración puede tener lugar al menos una vez al día durante un determinado número de días consecutivos, por ejemplo, durante 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más días consecutivos, o puede ser, por ejemplo, cada dos días, o 3 veces a la semana, o una vez cada 7 ± 3 días, o una vez cada 14 ± 3 días, o una vez cada 28 ± 3 días. El calendario de las administraciones puede comenzar con uno de esos programas y después de un periodo adecuado de tratamiento cambiar a otro que sea más o menos frecuente. El periodo completo de tratamiento puede completarse en, por ejemplo, ocho o doce o dieciséis semanas, o hasta seis meses, pero de forma más preferida continuará siempre que el paciente parezca beneficiarse del tratamiento. Por ejemplo, el programa de dosificación podría ser:

Ciclo 1:

semana 1: una dosis en cada uno de los días 1-5;

semana 2: 3 veces en días alternos, por ejemplo, una dosis en cada uno de los días 8, 10 y 12;

semanas 3 y 4: una dosis por semana (cada 7 (+/- 3) días);

Ciclo 2: una dosis durante la semana 5;

y cualquier ciclo posterior: una dosis 28 (+/- 3) días después de la dosis anterior más reciente.

La relación molar del polipéptido SapC con respecto al lípido fosfatidilserina en una composición de la invención puede encontrarse en el intervalo de 1:2 a 1:50, por ejemplo 1:5 a 1:30, o 1:8 a 1:20, o 1:11 a 1:13. Las relaciones molares adecuadas incluyen 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14 y 1:15. La relación en masa del polipéptido con respecto al lípido fosfatidilserina se encuentra en el intervalo de aproximadamente 1:0,18 a aproximadamente 1:4,5, o aproximadamente 1:0,45 a aproximadamente 1:2,7, o aproximadamente 1:0,72 a aproximadamente 1:1,81, o aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:1,2. Se reconoce que la relación preferida de polipéptido y lípido en una composición de la invención puede verse afectada por determinados factores tales como el tipo de célula diana y la vía de administración.

Se puede encontrar información útil de antecedentes y detalles técnicos en las patentes de Estados Unidos N° 7.834.147 y 9.271.932.

Las composiciones y los procedimientos están respaldados además por la información proporcionada en los ejemplos siguientes.

Ejemplos

5

Materiales

Los reactivos siguientes se adquirieron de proveedores comerciales: citrato de sodio dihidratado, ácido cítrico anhidro, glicina, fosfato de sodio monobásico monohidratado (EMD), fosfato de sodio dibásico heptahidratado (Thermo Scientific), tris(hidroximetil)aminometano ("Tris"; JT Baker), L-histidina, cloruro de sodio, agua HyClone™ (Thermo Scientific), hidróxido de sodio, D-trehalosa anhidra (VWR International), D(+)-trehalosa dihidratada (Spectrum), sacarosa (BDH Chemicals), manitol (BDH Chemicals), cloruro de sodio al 0,9%, t-butanol (Sigma Aldrich), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (sal sódica de DOPS) (Avanti Polar Lipids).

15 La saposina C ("SapC") se preparó mediante procedimientos convencionales utilizando expresión recombinante en células de E. coli.

Ejemplo 1. Determinación de cómo los agentes tampón seleccionados afectan a la estabilidad de las composiciones que comprenden SapC

20

Para determinar cómo los agentes tampón afectan a la estabilidad de SapC, se prepararon y se analizaron composiciones de SapC en agentes tampón seleccionados enumerados en las tablas 1 y 2 mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y dicroísmo circular (CD).

25 **Procedimientos**

Se prepararon las composiciones enumeradas en la tabla 1 y la tabla 2.

Tabla 1: Composiciones preparadas para análisis DSC

30

UID	Descripción
75312-F9	5 mg/ml de SapC, citrato 10 mM pH 6
75312-F10	5 mg/ml de SapC, fosfato 10 mM pH 7
75312-F11	5 mg/ml de SapC, Tris 10 mM pH 7,5
75312-F12	5 mg/ml de SapC, Tris 10 mM pH 8
75312-F13	5 mg/ml de SapC, fosfato 10 mM pH 7,5, NaCl al 1,68% p/v
75312-F14	5 mg/ml de SapC, fosfato 50 mM pH 7,5, NaCl al 1,20% p/v
75312-F15	5 mg/ml de SapC, glicina 10 mM pH 9

Tabla 2: Composiciones preparadas para análisis CD

UID	Descripción
75312-F1	1 mg/ml de SapC, citrato 10 mM pH 6
75312-F2	1 mg/ml de SapC, fosfato 10 mM pH 7
75312-F3	1 mg/ml de SapC, Tris 10 mM pH 7,5
75312-F4	1 mg/ml de SapC, Tris 10 mM pH 8
75312-F5	1 mg/ml de SapC, fosfato 10 mM, NaCl al 1,68% p/v, pH 7,5
75312-F6	1 mg/ml de SapC, fosfato 50 mM, NaCl al 1,20% p/v, pH 7,5
75312-F7	1 mg/ml de SapC, glicina 10 mM pH 9

35 Las mediciones DSC se realizaron utilizando un calorímetro MicroCal™ VP-DSC (Northampton, MA). Los parámetros de ejecución incluyeron un intervalo de temperatura de 10 a 110 °C, una velocidad de exploración de 60 °C por hora y un periodo de filtración de 16 segundos. Las muestras se preequilibraron durante 15 minutos antes de cada exploración. Los termogramas se procesaron utilizando el módulo adicional de calorímetro MicroCal™ VP-DSC para la versión 7 de Origin. Una fusión DSC detecta el despliegue de una proteína supervisando el cambio en la entalpía asociado con el evento. El despliegue de proteínas suele ser exotérmico y está marcado por un pico en la lectura del termograma, y el vértice representa la transición en la que se despliegan la mitad de las moléculas proteicas. Una temperatura de fusión (Tf) alta significa una alta estabilidad conformacional intrínseca.

40

Las mediciones CD se realizaron utilizando un espectropolarímetro Chirascan™ plus (Leatherhead, Reino Unido) con un controlador de temperatura Peltier de 4 posiciones. Se obtuvo un espectro de UV lejano de cada muestra a lo largo de un intervalo de longitud de onda de 180-260 nm a 10 °C utilizando una cubeta de 0,1 cm de longitud de trayectoria. Los espectros de las muestras de control respectivas se restaron de los espectros de las muestras de ensayo correspondientes. El porcentaje de estructura secundaria se estimó utilizando el programa informático CDNN proporcionado con el instrumento. Se determinó que las muestras con una concentración de SapC de 1 mg/ml debían diluirse para evitar la saturación en las longitudes de onda más bajas de los espectros CD. Por lo tanto, se realizó una dilución de 6 veces para cada una de las muestras antes de las mediciones CD.

Resultados

La figura 1 es un gráfico que representa los resultados del análisis DSC de la muestra 75312-F10. El termograma para la muestra 75312-F10, y también para todas las muestras analizadas (datos no mostrados), carecía de una transición esperada para el despliegue de proteínas. Sin desear vincularse a ninguna teoría particular, los solicitantes plantean la hipótesis de que (1) la proteína SapC carece de estructura(s) terciaria(s) o (2) la proteína SapC no se despliega incluso a la temperatura más alta de 110 °C.

La figura 2 es un gráfico que representa los resultados del análisis CD de las muestras enumeradas en la tabla 2. Los espectros de CD de todas las muestras muestran mínimos a aproximadamente 208 y 220 nm, una característica indicativa de un contenido significativo de α -hélice. El análisis de los espectros reveló una dependencia del pH en las magnitudes de los espectros en el orden de pH 7,0 > 7,5 \approx 6,0 > 8,0 > 9,0.

El porcentaje de estructura secundaria para cada muestra se estimó a partir de los espectros CD utilizando procedimientos conocidos en la técnica y se indica en la tabla 3. La figura 3 es un gráfico que representa el porcentaje de hélice α y arrollamiento aleatorio estimado a partir del análisis CD de muestras enumerados en la tabla 2. En particular, las cantidades más altas y más bajas de α -hélice se correlacionaron con el pH de la muestra, siendo la cantidad más alta en 75312-F2 (pH 7) y la más baja en 75312-F7 (pH 9). Estos datos indican que SapC probablemente retiene actividad, tal como se infiere a partir de la conservación de los componentes de la estructura secundaria, cuando se almacena en fosfato a pH 7 o en Tris a pH 7,6. Estos datos también indican que la variación de la concentración de tampón, específicamente fosfato 10 o 50 mM (comparación de 75312-F5 con 75312-F6), manteniendo a la vez la tonicidad constante no confirió diferencias en la estructura secundaria de SapC.

Tabla 3: Porcentaje de estructura secundaria estimado en cada composición

UID	Hélice	Lámina β antiparalela	Lámina β paralela	Giro β	Arrollamiento aleatorio	Suma total
75312-F1	64,9	3,2	3,3	12,5	14,0	97,9
75312-F2	83,4	1,4	1,6	9,7	7,2	103,4
75312-F3	69,6	2,7	2,8	11,8	12,5	99,4
75312-F4	46,6	5,7	5,8	14,9	23,1	96,2
75312-F5	45,4	6,0	6,0	15,1	23,5	96,0
75312-F6	47,0	5,7	5,7	14,9	22,8	96,1
75312-F7	21,0	13,6	13,0	19,6	42,1	109,4

Ejemplo 2. Determinación de cómo determinados agentes tampón (y concentraciones) afectan a la estabilidad y a la pureza de las composiciones de SapC almacenadas a 60 °C

Para determinar cómo varios agentes tampón afectan a la estabilidad y a la pureza de las composiciones que comprenden SapC, se prepararon composiciones de SapC en agentes tampón seleccionados enumerados en la tabla 4, se almacenaron a 60 °C y se analizaron para determinar la apariencia visual, el contenido total de proteína y la pureza del contenido de proteína.

Procedimientos

Se prepararon las composiciones enumeradas en la tabla 4. Algunas muestras se congelaron inmediatamente después de su preparación ($t = 0$ días) y se mantuvieron a -70 °C hasta el momento del análisis; otras se almacenaron durante 10 días a 60 °C ($t = 10$ días) antes de congelarlas y se mantuvieron a -70 °C hasta el momento del análisis. A continuación, las muestras congeladas se descongelaron a temperatura ambiente y se analizaron las propiedades siguientes: (1) la apariencia se evaluó mediante la caracterización visual del líquido bajo luz brillante para observar la transparencia, el color y la presencia de cualquier material particulado en la muestra; (2) el pH se cuantificó utilizando un medidor de pH; (3) el contenido de proteína total se cuantificó mediante análisis UV a 280 nm utilizando un

coeficiente de extinción de $0,395 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$; (4) la pureza del contenido de proteína, específicamente el porcentaje de SapC de longitud completa en la muestra y la presencia (y concentración de) productos de degradación de SapC se evaluó por SE-HPLC, RP-HPLC e IEX-HPLC. SE-HPLC, RP-HPLC e IEX-HPLC son procedimientos de cromatografía que separan el analito por tamaño, por hidrofobicidad y por variantes de carga, respectivamente.

5

Tabla 4: Lista de composiciones

UID	Descripción
183-001-01-095-F1	2 mg/ml de SapC, histidina 10 mM pH 6
183-001-01-095-F2	2 mg/ml de SapC, histidina 50 mM pH 6
183-001-01-095-F3	5 mg/ml de SapC, histidina 10 mM pH 6
183-001-01-095-F4	5 mg/ml de SapC, histidina 50 mM pH 6
183-001-01-095-F5	2 mg/ml de SapC, fosfato 10 mM pH 6,8
183-001-01-095-F6	2 mg/ml de SapC, fosfato 50 mM pH 6,8
183-001-01-095-F7	5 mg/ml de SapC, fosfato 10 mM pH 6,8
183-001-01-095-F8	5 mg/ml de SapC, fosfato 50 mM pH 6,8
183-001-01-095-F9	2 mg/ml de SapC, Tris 10 mM pH 7,6
183-001-01-095-F10	2 mg/ml de SapC, Tris 50 mM pH 7,6
183-001-01-095-F11	5 mg/ml de SapC, Tris 10 mM pH 7,6
183-001-01-095-F12	5 mg/ml de SapC, Tris 50 mM pH 7,6

Resultados

10

Las apariencias visuales de las muestras se resumen en la tabla 5. En $t = 0$ días, 183-001-01-095-F2, -F4, -F5, -F6 y -F7 se encontraban desprovistos de partículas visibles, mientras que 183-001-01-095-F1, -F3, -F8, -F9, -F10, -F11 y -F12 eran en su mayor parte transparentes con algunas partículas. Después de una incubación a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 días, todas las muestras tenían unas pocas partículas, presentando 183-001-01-095-F5, -F6 y -F8 tamponados con fosfato partículas "largas". Además, algunas muestras que contenían histidina y fosfato adquirieron un ligero tinte amarillo, específicamente 183-001-01-095-F3, -F4, -F7 y -F8.

15

Tabla 5: Apariencia de cada composición después de $t = 0$ y $t = 10$ días

UID	$t = 0$ días	$t = 10$ días
183-001-01-095-F1	Transparente, incoloro, pocas partículas	Transparente, incoloro, pocas partículas
183-001-01-095-F2	Transparente, incoloro, sin partículas visibles	Tinte ligeramente amarillo, transparente, pocas partículas
183-001-01-095-F3	Transparente, incoloro, pocas partículas	Tinte ligeramente amarillo, transparente, pocas partículas
183-001-01-095-F4	Transparente, incoloro, sin partículas visibles	Tinte ligeramente amarillo, transparente, pocas partículas
183-001-01-095-F5	Transparente, incoloro, sin partículas visibles	Transparente, incoloro, pocas partículas largas
183-001-01-095-F6	Transparente, incoloro, sin partículas visibles	Transparente, incoloro, pocas partículas largas
183-001-01-095-F7	Transparente, incoloro, sin partículas visibles	Tinte ligeramente amarillo, transparente, pocas partículas
183-001-01-095-F8	Transparente, incoloro, pocas partículas	Tinte ligeramente amarillo, transparente, pocas partículas
183-001-01-095-F9	Transparente, incoloro, pocas partículas	Transparente, incoloro, pocas partículas
183-001-01-095-F10	Transparente, incoloro, pocas partículas	Transparente, incoloro, pocas partículas
183-001-01-095-F11	Transparente, incoloro, pocas partículas	Transparente, incoloro, pocas partículas
183-001-01-095-F12	Transparente, incoloro, pocas partículas	Transparente, incoloro, pocas partículas

5 El pH de cada muestra se indica en la tabla 6. Las muestras tamponadas con fosfato (183-001-01-095-F5, -F6, -F7, -F8) se desviaron a un pH más básico que su pH objetivo de 6,8, a ambos puntos temporales. En particular, el pH de las muestras tamponadas con fosfato 10 mM (183-001-01-095-F5 y -F7) se desvió más que las muestras tamponadas con fosfato 50 mM (183-001-01-095-F6 y -F8). Todas las muestras tamponadas con histidina (183-001-01-095-F1, -F2, -F3 y -F4) o Tris (183-001-01-095-F9, -F10, -F11 y -F12) mantuvieron su valor de pH inicial dentro de un intervalo de 0,1 unidades de pH.

Tabla 6: pH de cada muestra después de t = 0 y t = 10 días

UID	t = 0 días	t = 10 días
183-001-01-095-F1	6,12	6,11
183-001-01-095-F2	5,98	5,96
183-001-01-095-F3	6,22	6,25
183-001-01-095-F4	6,01	6,01
183-001-01-095-F5	7,31	7,29
183-001-01-095-F6	7,10	7,09
183-001-01-095-F7	7,25	7,30
183-001-01-095-F8	7,08	7,09
183-001-01-095-F9	7,55	7,57
183-001-01-095-F10	7,54	7,54
183-001-01-095-F11	7,59	7,60
183-001-01-095-F12	7,52	7,53

10 El contenido de proteína total en cada una de las muestras se indica en la tabla 7. En t = 0, todas las muestras mostraron concentraciones de proteína cercanas a los valores objetivo de 2 o 5 mg/ml. Sin embargo, en t = 10 días, la mayor parte de las muestras tenían una mayor concentración de proteínas. Estos números inflados son probablemente un artefacto de dispersión espectral debido al aumento de partículas grandes en las muestras. Para
 15 cuantificar el aumento de la dispersión, se midieron exploraciones de densidad óptica (200 a 400 nm) para cada muestra para evaluar el grado de aumento de la dispersión durante el almacenamiento. La figura 4 es un gráfico que representa para cada muestra el valor de densidad óptica a 310 nm, una longitud de onda carente de señal de absorción significativa (obsérvese que la muestra 183-001-01-095-F11 no se analizó). Las muestras tamponadas con histidina a pH 6 (183-001-01-095-F1, -F2, -F3 y -F4) y las muestras tamponadas con fosfato a pH 6,8 (183-001-01-095-F5, -F6, -F7 y -F8) mostraron un aumento de la dispersión después de 10 días. En particular, las muestras 183-001-01-095-F9, -F10 y -F12 tamponadas con Tris a pH 7,6 mostraron incrementos mínimos en la dispersión después de 10 días.

Tabla 7: Contenido de proteína total (mg/ml) en composiciones después de t = 0 y t = 10 días

UID	t = 0 días	t = 10 días
183-001-01-095-F1	2,01	2,34
183-001-01-095-F2	2,08	3,12
183-001-01-095-F3	4,82	5,57
183-001-01-095-F4	4,97	6,70
183-001-01-095-F5	2,08	2,36
183-001-01-095-F6	2,13	2,52
183-001-01-095-F7	4,99	5,53
183-001-01-095-F8	5,00	5,92
183-001-01-095-F9	2,07	2,09
183-001-01-095-F10	2,03	2,09
183-001-01-095-F11	5,05	5,18
183-001-01-095-F12	4,99	5,22

La pureza de SapC en las muestras se estimó mediante SE-HPLC, RP-HPLC e IEX-HPLC. La pureza de SapC en las muestras se cuantificó como el porcentaje de contenido de proteína detectado en el pico de elución que comprende SapC de longitud completa. La figura 5 es un gráfico que representa las mediciones SE-HPLC de pureza de SapC en $t = 0$ y después de 10 días a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Todas las muestras mostraron una pureza de SapC superior al 95 por ciento después de 10 días, detectada por SE-HPLC. En particular, se esperaba que las muestras tamponadas con histidina a pH 6 (183-001-01-095-F1, -F2, -F3 y -F4) y las muestras tamponadas con fosfato a pH 6,8 (183-001-01-095-F5, -F6, -F7 y -F8) que presentaban una mayor dispersión a una DO 310 nm contuvieran especies de peso molecular de orden superior (es decir, agregados); sin embargo, no se observaron dichas especies por SE-HPLC en estas muestras. Si estos supuestos agregados eran demasiado grandes para pasar a través de la columna, entonces la concentración aparente de la proteína (basada en el área cromatográfica) habría disminuido. Esto tampoco se observó, ya que la recuperación del pico principal de SapC fue alta incluso después de 10 días en esas muestras. Sin desear vincularse a ninguna teoría particular, los solicitantes señalan que una posibilidad que podría explicar estos resultados es que la materia particulada observada en F1-F8 no comprende, o comprende una cantidad insignificante de, SapC o fragmentos de SapC.

La figura 6 es un gráfico que representa las mediciones RP-HPLC de pureza de SapC en $t = 0$ y después de 10 días a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Todas las muestras mostraron algún grado de reducción de pureza de SapC después de 10 días, medida por RP-HPLC. Las muestras tamponadas con fosfato a pH 6,8 (183-001-01-095-F5, -F6, -F7 y -F8) mostraron las mayores disminuciones en pureza de SapC.

La figura 7 es un gráfico que representa las mediciones IEX-HPLC de pureza de SapC en $t = 0$ y después de 10 días a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Todas las muestras mostraron algún grado de reducción de pureza de SapC después de 10 días, medida por IEX-HPLC. Como sucedió cuando las mediciones se realizaron con RP-HPLC (véase anteriormente), las muestras tamponadas con fosfato a pH 6,8 (183-001-01-095-F5, -F6, -F7 y -F8) mostraron las mayores disminuciones en pureza de SapC.

En resumen, estos datos indican que las muestras que comprenden Tris a pH 7,6 mostraron una mayor estabilidad y pureza en comparación con las muestras que comprenden histidina a pH 6 o fosfato a pH 6,8.

Ejemplo 3. Determinación de cómo determinadas concentraciones de citrato a pH 6,2 afectan a la estabilidad y a la pureza de las composiciones que comprenden SapC expuestas a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$

Para determinar cómo el citrato afecta a la estabilidad y a la pureza de las composiciones que comprenden SapC, se prepararon varias composiciones de SapC en citrato a pH 6,2, se almacenaron a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se analizaron para determinar la apariencia, el pH, el contenido de proteína y mediante procedimientos de cromatografía.

Procedimientos

Se tomaron muestras de las composiciones enumeradas en la tabla 8 en $t = 0$ (inmediatamente después de la preparación) y después del almacenamiento a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 días ($t = 10$ días), después se congelaron y se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento del análisis. Las composiciones congeladas se descongelaron a temperatura ambiente y se analizaron las propiedades siguientes tal como se describe en el ejemplo 2: apariencia visual, pH, contenido de proteína total y pureza del contenido de proteína.

Tabla 8: Composiciones que contienen citrato

UID	Descripción
82014-F1	2 mg/ml de SapC, citrato 10 mM pH 6,2
82014-F2	2 mg/ml de SapC, citrato 50 mM pH 6,2
82014-F3	5 mg/ml de SapC, citrato 10 mM pH 6,2
82014-F4	5 mg/ml de SapC, citrato 50 mM pH 6,2
82014-control de citrato 1	Citrato 10 mM pH 6,2
82014-control de citrato 2	Citrato 50 mM pH 6,2

Resultados

La apariencia visual y el pH de cada muestra se indican en la tabla 9. Todas las muestras eran líquidos transparentes e incoloros en ambos puntos temporales. El pH de todas las muestras se mantuvo dentro de un intervalo de 0,2 unidades de pH del valor de pH inicial después de 10 días a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$; sin embargo, el pH inicial de todas las muestras fue más básico que el pH objetivo de 6,2.

Tabla 9: Apariencia visual y pH de cada muestra después de t = 0 y t = 10 días

Muestra N°	Punto temporal	Apariencia	pH
82014-F1	t = 0	Solución transparente e incolora	6,62
	t = 10	Solución transparente e incolora	6,63
82014-F2	t = 0	Solución transparente e incolora	6,32
	t = 10	Solución transparente e incolora	6,26
82014-F3	t = 0	Solución transparente e incolora	6,71
	t = 10	Solución transparente e incolora	6,92
82014-F4	t = 0	Solución transparente e incolora	6,31
	t = 10	Solución transparente e incolora	6,32
82014-Control de citrato 1	t = 0	Solución transparente e incolora	6,48
	t = 10	Solución transparente e incolora	6,64
82014-Control de citrato 2	t = 0	Solución transparente e incolora	6,29
	t = 10	Solución transparente e incolora	6,31

5 La figura 8 es un gráfico que representa la densidad óptica cuando se analiza a 310 nm para cada composición de la tabla 8 en t = 0 y después de 10 días a 60 °C. Ninguna composición mostró un aumento significativo de la densidad óptica a 310 nm después de 10 días.

10 La figura 9 es un gráfico que representa las mediciones RP-HPLC de pureza de SapC de las composiciones de la tabla 8 en t = 0 y después de 10 días a 60 °C. Todas las composiciones mostraron una disminución de la pureza de SapC después de 10 días según esta medición.

15 La figura 10 es un gráfico que representa las mediciones SE-HPLC de pureza de SapC de las composiciones de la tabla 8 en t = 0 y después de 10 días a 60 °C. Ninguna de las composiciones mostró cambios significativos en la pureza de SapC después de 10 días.

La figura 11 es un gráfico que representa las mediciones IEX-HPLC de pureza de SapC de las composiciones de la tabla 8 en t = 0 y después de 10 días a 60 °C. Todas las muestras mostraron una disminución de pureza de SapC después de 10 días según esta medición.

20 En resumen, estos datos indican que las muestras que comprenden 2 o 5 mg/ml de SapC y citrato 10 o 50 mM a un pH objetivo de pH 6,2 (pH real hasta 6,64) mostraron una estabilidad y una pureza similares durante 10 días a 60 °C. Basándose en estos datos y los datos de los ejemplos anteriores, los agentes tampón potenciales para las composiciones que comprenden SapC incluyen citrato a un pH aproximado de 6,2 y Tris a un pH aproximado de 7,6.

25 **Ejemplo 4.** Determinación de la estabilidad de composiciones que comprenden SapC y Tris 25 mM pH 7,2 tras una exposición a estrés mecánico o térmico

30 Para cuantificar la estabilidad de las composiciones que comprenden SapC y Tris 25 mM pH 7,2 tras una exposición a estrés mecánico o térmico, las composiciones se expusieron a estrés mecánico o térmico y se analizaron para determinar la apariencia visual, el pH y el contenido de proteína total.

Procedimientos

35 Se preparó la composición 183-001-01-220-F1 que comprendía 5 mg/ml de SapC, Tris 25 mM pH 7,1-7,2, y se expusieron muestras de la misma a estrés por descongelación libre o estrés por agitación. Para cada muestra, se sometieron a ensayo las propiedades siguientes tal como se describe en el ejemplo 2: apariencia visual, pH y contenido de proteína total.

40 Para los análisis de estrés de congelación-descongelación, las muestras se dividieron en partes alícuotas de 1,3 ml en viales de PETG de 5 ml y se sometieron a cinco ciclos de congelación-descongelación. Para cada ciclo, los viales se congelaron a -70 °C y se descongelaron a temperatura ambiente. Después de cada descongelación, el contenido de cada vial se mezcló invirtiéndolo suavemente aproximadamente 5 veces antes de llevarlo de nuevo a -70 °C para el siguiente ciclo.

45 Para los análisis de estrés por agitación, las muestras se dividieron en partes alícuotas de 1,3 ml en ocho viales de PETG. Se agitaron cuatro de los viales en un agitador orbital (Thermo Scientific, modelo N° 2309) a 220 rpm durante

15 o 24 horas a temperatura ambiente. Paralelamente, los cuatro viales restantes se dispusieron en la parte superior de la mesa cerca del agitador como controles estacionarios. A las 15 y 24 horas, se analizaron dos viales del grupo de ensayo y dos del grupo de control.

5 Resultados

Todas las muestras eran líquidos transparentes e incoloros (datos no mostrados).

10 El pH de cada muestra se indica en la figura 12. El pH de todas las muestras se mantuvo dentro de un intervalo de 0,1 unidades de pH del valor de pH inicial.

15 El contenido de proteína total en cada una de las muestras se indica en la figura 13. El contenido de proteína de todas las muestras estresadas se mantuvo dentro del 3 por ciento del contenido de proteína total en la muestra no estresada en t = 0.

En resumen, las composiciones sometidas a ensayo que comprenden SapC y Tris 25 mM pH 7,1 (el pH real fue 7,1 en t = 0; el pH objetivo fue 7,2) mostraron estabilidad después de la exposición a estrés mecánico o térmico evaluada mediante la apariencia visual, el pH y el contenido de proteína total.

20 **Ejemplo 5.** Determinación de cómo varias concentraciones de t-butanol (TBA) afectan a la estabilidad y a la pureza de las composiciones que comprenden SapC y dioleoilfosfatidilserina (DOPS)

25 Se usó t-butanol (o alcohol t-butílico; TBA) como disolvente orgánico para disolver DOPS antes de incorporar DOPS en diversas composiciones de SapC. Para determinar cómo las diversas concentraciones de TBA afectan a la estabilidad y a la pureza de las composiciones que comprenden SapC, se prepararon, se filtraron y se analizaron las composiciones que comprenden las concentraciones de TBA enumeradas en la tabla 10 para determinar la apariencia visual, el contenido de proteína total y el contenido de DOPS.

30 Procedimientos

Las composiciones enumeradas en la tabla 10 se prepararon y se evaluaron antes y después de una filtración estéril estándar a través de un filtro de 0,2 micrómetros. Todos los porcentajes son p/p. La apariencia visual y el contenido de proteína total en cada composición se analizaron tal como se describe en el ejemplo 2. El contenido de DOPS total en cada composición se analizó mediante HPLC-ELSD.

35

Tabla 10: Composiciones que contienen TBA

UID	Descripción
183-001-01-050-F1	2,3 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, 9 por ciento de trehalosa, 30 por ciento de TBA, Tris 50 mM pH 7,2
183-001-01-050-F2	2,3 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, 9 por ciento de trehalosa, 25 por ciento de TBA, Tris 50 mM pH 7,2
183-001-01-050-F3	2,3 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, 9 por ciento de trehalosa, 20 por ciento de TBA, Tris 50 mM pH 7,2
183-001-01-050-F4	2,3 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, 9 por ciento de trehalosa, 15 por ciento de TBA, Tris 50 mM pH 7,2

40 Resultados

La apariencia visual de cada muestra se describe en la tabla 10. Todas las muestras eran líquidos transparentes e incoloros tanto antes como después de la filtración.

45 Tabla 11: Apariencia visual de cada muestra antes y después de la filtración

UID	Antes de la filtración	Después de la filtración
183-001-01-050-F1	Transparente, incoloro y sin partículas	Transparente, incoloro y sin partículas
183-001-01-050-F2	Transparente, incoloro y sin partículas	Transparente, incoloro y sin partículas
183-001-01-050-F3	Transparente, incoloro y sin partículas	Transparente, incoloro y sin partículas
183-001-01-050-F4	Transparente, incoloro y sin partículas	Transparente, incoloro y sin partículas

El contenido de proteína total de cada muestra se indica en la tabla 12. Ninguna de las muestras mostró cambios significativos en el contenido de proteína antes y después de la filtración.

5 Tabla 12: Contenido de proteína total (mg/ml) en cada composición antes y después de la filtración

UID	Antes de la filtración	Después de la filtración
183-001-01-050-F1	2,25	2,3
183-001-01-050-F2	2,59	2,55
183-001-01-050-F3	2,21	2,26
183-001-01-050-F4	2,49	2,51

El contenido total de DOPS en cada muestra se indica en la tabla 13. Las composiciones no mostraron cambios significativos en el contenido de DOPS antes y después de la filtración.

10 Tabla 13: Contenido total de DOPS (mg/ml) en cada composición antes y después de la filtración

UID	Antes de la filtración	Después de la filtración
183-001-01-050-F1	3,06	3,10
183-001-01-050-F2	2,98	3,04
183-001-01-050-F3	2,97	2,97
183-001-01-050-F4	3,00	2,94

15 En resumen, estos datos indican que las muestras que comprenden del 15 al 35 por ciento de TBA mostraron una apariencia visual, un contenido de proteína y un contenido de DOPS similares antes y después de la filtración.

Ejemplo 6. Determinación de cómo determinados excipientes y agentes tampón afectan a la estabilidad y a la pureza de las composiciones que comprenden SapC y DOPS

20 Para determinar cómo determinados excipientes y agentes tampón afectan a la estabilidad y a la pureza de las composiciones que comprenden SapC, se prepararon las composiciones enumeradas en la tabla 14 y se evaluó la estabilidad y la pureza de cada composición.

25 Procedimientos

Se prepararon las composiciones enumeradas en la tabla 14 y se liofilizaron partes alícuotas de 1,2 ml según el procedimiento de liofilización descrito en la tabla 15. Después, cada muestra liofilizada se reconstituyó con 1,2 ml de agua purificada HyClone™ y se dejó que las tortas liofilizadas se disolvieran completamente.

30 Las propiedades siguientes se analizaron tal como se describe en el ejemplo 2: apariencia visual, contenido de proteína total y pureza del contenido de proteína. El contenido de humedad en cada muestra liofilizada se determinó mediante un procedimiento coulombimétrico. El porcentaje de TBA en cada muestra se determinó mediante un procedimiento de espacio de cabeza de CG-EM. (El TBA en las muestras era lo que quedaba del TBA utilizado como disolvente para DOPS, después de la sublimación de la mayor parte del TBA de las muestras durante el proceso de liofilización).

35 En un experimento adicional, se almacenó una muestra de cada composición reconstituida a 50 °C durante 2 o 5 semanas y se evaluó su estabilidad mediante la apariencia visual y la pureza del contenido de proteína analizadas tal como se describe en el ejemplo 2, mediante la pureza medida utilizando RP-HPLC y por distribución del tamaño de partícula. Los tamaños de las partículas en cada líquido reconstituido en t = 0 y t = 5 semanas se determinaron mediante dispersión de luz dinámica utilizando un instrumento Malvern.

40 Tabla 14: Composiciones preparadas para liofilización y reconstitución

UID	Descripción
76114-F1	0,4 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, 25 por ciento de TBA, 9 por ciento de sacarosa, Tris 10 mM pH 8
76114-F2	0,4 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, 25 por ciento de TBA, 9 por ciento de trehalosa, Tris 10 mM pH 8

UID	Descripción
76114-F3	0,4 mg/ml de SapC, SapC: proporción molar de DOPS de 1:12, 25 por ciento de TBA, 4 por ciento de manitol, 1 por ciento de sacarosa, Tris 10 mM pH 8
76114-F4	0,4 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, 25 por ciento de TBA, 9 por ciento de sacarosa, Tris 10 mM pH 7,2
76114-F5	0,4 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, 25 por ciento de TBA, 9 por ciento de trehalosa, Tris 10 mM pH 7,2
76114-F6	0,4 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, 25 por ciento de TBA, 4 por ciento de manitol, 1 por ciento de sacarosa, Tris 10 mM pH 7,2
76114-F7	0,4 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, 25 por ciento de TBA, 9 por ciento de sacarosa, histidina 10 mM pH 6,5
76114-F8	0,4 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, TBA al 25 por ciento, 8 por ciento de trehalosa, histidina 10 mM pH 6,5
76114-F9	0,4 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, 25 por ciento de TBA, 4 por ciento de manitol, 1 por ciento de sacarosa, histidina 10 mM pH 6,5

Tabla 15: Ciclo de liofilización utilizado para preparar composiciones liofilizadas

Objetivo	Descripción
Carga	Mantener a 5 °C
Congelación	Rampa a 0,3 °C/min durante 183 min; Mantener a -50 °C durante 60 min; Rampa a 0,3 °C/min durante 133 min; Mantener a -10 °C durante 120 min; Rampa a 0,3 °C/min durante 133 min; Mantener a -5 0 °C durante 180 min
Secado primario	Mantener a -50 °C durante 30 min a 50 mTorr; Rampa a 0,3 °C/min durante 67 min a 50 mTorr; Mantener a -40 °C durante 2400 min a 50 mTorr
Secado secundario	Rampa a 0,5 °C/min durante 120 min, 50 mTorr; Mantener a 30 °C durante 480 min a 50 mTorr

5 Resultados

La apariencia visual de cada muestra se resume en la tabla 16. Todas las muestras que contenían el 9 por ciento de sacarosa mostraron partículas tras la reconstitución en t = 0, mientras que todas las muestras que contenían trehalosa estaban desprovistas de partículas, una consideración importante para una composición inyectable.

10

Tabla 16: Apariencia visual de la torta liofilizada y del líquido reconstituido en t = 0

UID	Torta liofilizada	Líquido reconstituido en t = 0
76114-F1	Blanca esponjosa, algo de agrietamiento	Turbio, se ven partículas; partículas sedimentadas tras la centrifugación
76114-F2	Blanca esponjosa, algo de agrietamiento	Transparente, incoloro, sin partículas
76114-F3	Blanca esponjosa, algo de agrietamiento	Ligeramente turbio, sin partículas
76114-F4	Blanca esponjosa, algo de agrietamiento y encogimiento	Turbio, se ven partículas; partículas sedimentadas tras la centrifugación
76114-F5	Blanca esponjosa, algo de agrietamiento y encogimiento	Transparente, incoloro, sin partículas
76114-F6	Blanca esponjosa, algo de agrietamiento	Ligeramente turbio, sin partículas
76114-F7	Blanca esponjosa, algo de agrietamiento y encogimiento	Turbio, se ven partículas; partículas sedimentadas tras la centrifugación
76114-F8	Blanca esponjosa, algo de agrietamiento y encogimiento	Transparente, incoloro, sin partículas
76114-F9	Blanca esponjosa, algo de agrietamiento	Transparente, incoloro, sin partículas

El contenido de proteína total de cada composición reconstituida se indica en la tabla 17.

Tabla 17: Contenido de proteína total (mg/ml) en cada composición reconstituida en t = 0, evaluado por RP-HPLC

UID	Contenido de proteína total (mg/ml)	Porcentaje de recuperación de SapC frente a la teórica
76114-F1	0,38	91
76114-F2	0,37	87
76114-F3	0,37	88
76114-F4	0,37	87
76114-F5	0,36	87
76114-F6	0,37	89
76114-F7	0,36	86
76114-F8	0,36	85
76114-F9	0,38	91

5 La pureza de SapC en cada composición reconstituida en t = 0 se indica en la tabla 18.

Tabla 18: Pureza de SapC en cada composición evaluada por RP-HPLC e IEX-HPLC en t = 0

UID	Porcentaje de pureza de SapC por RP-HPLC	Porcentaje de pureza de SapC por IEX-HPLC
76114-F1	93,2	96,1
76114-F2	93,2	95,9
76114-F3	93	96
76114-F4	93,6	96
76114-F5	93,5	95,8
76114-F6	93,6	96
76114-F7	93,6	95,8
76114-F8	91,8	95,8
76114-F9	93,9	95,9

10 El porcentaje de TBA en cada composición reconstituida se indica en la tabla 19. Todas las composiciones reconstituidas que comprenden el 9 por ciento de sacarosa (F1, F4 y F7) contenían niveles más altos de TBA residual en comparación con las otras composiciones analizadas.

Tabla 19: Porcentaje de TBA en cada composición reconstituida en t = 0

15

UID	Porcentaje de TBA
76114-F1	2,4
76114-F2	1,9
76114-F3	0,3
76114-F4	2,3
76114-F5	1,7
76114-F6	0,2
76114-F7	2,2
76114-F8	1,8
76114-F9	0,3

Tabla 20: Contenido de humedad en cada composición liofilizada

UID	Porcentaje de agua en t = 0
76114-F1	0,3
76114-F2	0,4
76114-F3	2,1
76114-F4	0,4
76114-F5	0,3
76114-F6	1,1
76114-F7	0,4
76114-F8	0,3
76114-F9	1,0

5 La figura 14 es un gráfico que representa las mediciones RP-HPLC de pureza de SapC y el porcentaje de recuperación en composiciones reconstituidas en t = 0 y después del almacenamiento durante 2 semanas a 50 °C. La pureza de SapC después de 2 semanas a 50 °C se mantuvo superior al 90 por ciento en todas las muestras tamponadas con histidina a un pH de 6,5 (76114-F7, -F8 y -F9), así como en la muestra 76114-F6 (tamponada con Tris a un pH de 7,2).
10 Todas las demás muestras mostraron menos del 85 por ciento de pureza de SapC después de 2 semanas a 50 °C.

El material liofilizado para muestras que comprenden el 9 por ciento de sacarosa (76114-F1, -F4, - F7) se fundió después de 2 semanas a 50 °C (datos no mostrados), mientras que las otras muestras liofilizadas no mostraron cambios significativos en la apariencia visual después de 2 semanas a 50 °C.

15 La figura 15 es un gráfico que representa los resultados de la dispersión dinámica de la luz para la muestra 76114-F5 en t = 0 (A) y después de 5 semanas (B) a 50 °C. La figura 16 es un gráfico que representa los resultados de la dispersión dinámica de la luz para la muestra 76114-F6 en t = 0 (A) y después de 5 semanas (B) a 50 °C. Las composiciones que comprenden el 9 por ciento de trehalosa (F2, F5, F8) mostraron la distribución de volumen de tamaño de partícula más uniforme y reproducible por dispersión de luz dinámica en comparación con todas las demás composiciones analizadas.
20

En resumen, estos datos sugieren que la trehalosa es el excipiente de azúcar preferido, en comparación con la sacarosa y con una mezcla de manitol y sacarosa. Esto es a pesar del hecho de que las composiciones con mezclas de manitol/sacarosa mostraron el porcentaje más bajo de TBA de todas las composiciones analizadas. Además, estos datos indican que las composiciones que comprenden SapC y DOPS son más estables en Tris 10 mM a pH 6,5 o pH 7,2 en comparación con Tris 10 mM a pH 8.
25

Ejemplo 7. Determinación de cómo determinadas concentraciones de SapC y DOPS (a una relación molar constante de SapC con respecto a DOPS) afectan a la estabilidad y a la pureza de las composiciones que comprenden SapC y DOPS.
30

Para determinar cómo afectan diversas concentraciones de SapC y DOPS a la estabilidad y a la pureza de las composiciones, se prepararon las composiciones enumeradas en la tabla 21 y se evaluaron la estabilidad y la pureza de cada composición.
35

Procedimientos

Se prepararon las composiciones enumeradas en la tabla 21 y se liofilizaron partes alícuotas de 1,2 ml según el procedimiento de liofilización descrito en el ejemplo 6. Después, cada muestra liofilizada se reconstituyó con 1,2 ml de agua HyClone™ y se dejó que las tortas liofilizadas se disolvieran completamente. Los tamaños de partícula en cada muestra reconstituida en t = 0 se determinaron mediante dispersión de luz dinámica utilizando un instrumento Malvern.
40

Tabla 21: Composiciones pre-liofilización

UID	Descripción
76733-F1	4,2 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, 25 por ciento de TBA, 10 mg/ml de trehalosa, fosfato 25 mM pH 7,4
76733-F2	2,2 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, 25 por ciento de TBA, 10 mg/ml de trehalosa, fosfato 25 mM pH 7,4
76733-F3	1,3 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, 25 por ciento de TBA, 10 mg/ml de trehalosa, fosfato 25 mM pH 7,4
76733-F4	0,82 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, 25 por ciento de TBA, 10 mg/ml de trehalosa, fosfato 25 mM pH 7,4
76733-F5	0,42 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, 25 por ciento de TBA, 10 mg/ml de trehalosa, fosfato 25 mM pH 7,4

Resultados

5 La figura 17 es un gráfico que representa los resultados de la dispersión dinámica de la luz para cada muestra reconstituida en $t = 0$. La figura 18 es un gráfico que representa el cambio en la dispersión dinámica de la luz para cada muestra reconstituida a lo largo del tiempo. La composición con la concentración más alta de SapC, 4,2 mg/ml, mostró un tamaño de partícula promedio más alto con respecto a las composiciones con 2,2 mg/ml o concentraciones más bajas de SapC. Todas las composiciones reconstituidas mantuvieron un tamaño de partícula promedio constante durante el periodo de 4 horas, lo que sugiere un producto reconstituido estable. Estos resultados sugieren que la concentración preferida de SapC es inferior o igual a 2,2 mg/ml de SapC, a una relación molar de SapC a DOPS de 1:12.

15 **Ejemplo 8.** Determinación de cómo diversas concentraciones de manitol y trehalosa afectan a la estabilidad de las composiciones que comprenden DOPS

Para determinar cómo varias concentraciones de manitol y trehalosa afectan a la estabilidad y a la pureza de las composiciones que comprenden DOPS, se prepararon las composiciones descritas en las tablas 22 y 23, se liofilizaron y se reconstituyeron en agua.

Procedimientos

25 Se prepararon las composiciones enumeradas en la tabla 22 y se liofilizaron partes alícuotas de 0,8 ml en viales de 2 ml o partes alícuotas de 4 ml en viales de 10 ml según el proceso de liofilización descrito en el ejemplo 6. Cada vial de muestra liofilizada se reconstituyó con agua HyClone™; se dejó que las tortas liofilizadas se disolvieran completamente. La apariencia visual de las tortas liofilizadas y el porcentaje de TBA en cada muestra reconstituida se sometieron a ensayo tal como se describe en el ejemplo 6.

30 Tabla 22: Composiciones pre-liofilización

UID	Descripción
81494-F1	1,6 mg/ml de DOPS, histidina 10 mM pH 6, 1,5 por ciento de manitol
81494-F2	1,6 mg/ml de DOPS, histidina 10 mM pH 6, 0,3 por ciento de trehalosa
81494-F3	1,6 mg/ml de DOPS, histidina 10 mM pH 6, 0,9 por ciento de manitol
81494-F4	1,6 mg/ml de DOPS, histidina 10 mM pH 6, 1,5 por ciento de trehalosa
81494-F5	1,6 mg/ml de DOPS, histidina 10 mM pH 6, 5 por ciento de manitol
81494-F6	1,6 mg/ml de DOPS, histidina 10 mM pH 6, 4 por ciento de manitol, 1 por ciento de trehalosa
81494-F7	1,6 mg/ml de DOPS, histidina 10 mM pH 6, 3 por ciento de manitol, 2 por ciento de trehalosa
81494-F8	1,6 mg/ml de DOPS, histidina 10 mM pH 6, 5 por ciento de trehalosa
81494-F9	1,6 mg/ml de DOPS, histidina 10 mM pH 6, 9 por ciento de manitol
81494-F10	1,6 mg/ml de DOPS, histidina 10 mM pH 6, 7,2 por ciento de manitol, 1,8 por ciento de trehalosa
81494-F11	1,6 mg/ml de DOPS, histidina 10 mM pH 6, 5,4 por ciento de manitol, 3,6 por ciento de trehalosa
81494-F12	1,6 mg/ml de DOPS, histidina 10 mM pH 6, 9 por ciento de trehalosa

Las composiciones enumeradas en la tabla 23 se prepararon y se liofilizaron según el proceso de liofilización descrito en el ejemplo 6, con una modificación: la temperatura de secado primaria se mantuvo a -45 °C en lugar de mantenerla a -40 °C. Cada muestra liofilizada se reconstituyó con 1,2 ml de agua HyClone™; se dejó que las tortas liofilizadas se disolvieran completamente. Las propiedades siguientes se analizaron tal como se describe en el ejemplo 6: apariencia visual de tortas liofilizadas, porcentaje de TBA en cada muestra reconstituida y distribución del tamaño de partícula en cada muestra reconstituida.

5

Tabla 23: Composiciones pre-liofilización utilizadas en el proceso de liofilización modificado

UID	Descripción
183-001-01-114-F1	2,2 mg/ml de SapC, 2,4 mg/ml de DOPS, citrato 10 mM pH 6,2, 4 por ciento de manitol, 1 por ciento de trehalosa
183-001-01-114-F2	2,2 mg/ml de SapC, 2,4 mg/ml de DOPS, citrato 10 mM pH 6,2, 3,5 por ciento de manitol, 1,5 por ciento de trehalosa
183-001-01-114-F3	2,2 mg/ml de SapC, 2,4 mg/ml de DOPS, citrato 10 mM pH 6,2, 2 por ciento de trehalosa
183-001-01-114-F4	2,2 mg/ml de SapC, 2,4 mg/ml de DOPS, citrato 10 mM pH 6,2, 7,2 por ciento de manitol, 1,8 por ciento de trehalosa
183-001-01-114-F5	2,2 mg/ml de SapC, 2,4 mg/ml de DOPS, citrato 10 mM pH 6,2, 6,3 por ciento de manitol, 2,7 por ciento de trehalosa
183-001-01-114-F6	2,2 mg/ml de SapC, 2,4 mg/ml de DOPS, citrato 10 mM pH 6,2, 5,4 por ciento de manitol, 3,6 por ciento de trehalosa

10

Resultados

Las tablas 24 y 25 incluyen observaciones cualitativas de las composiciones liofilizadas, incluyendo si se formó o no torta, y si se formó torta, la integridad y la calidad de la torta.

15

Tabla 24: Apariencia de la torta liofilizada de las composiciones de la tabla 22

UID	Observaciones
81494-F1	No se formó ninguna torta
81494-F2	No se formó ninguna torta
81494-F3	No se formó ninguna torta
81494-F4	No se formó ninguna torta
81494-F5	No se formó ninguna torta
81494-F6	No se formó ninguna torta
81494-F7	Torta compacta y esponjosa sin grietas
81494-F8	Torta compacta y esponjosa sin grietas
81494-F9	Torta compacta y esponjosa sin grietas
81494-F10	Torta compacta y esponjosa sin grietas
81494-F11	Torta compacta y esponjosa sin grietas
81494-F12	Torta compacta y esponjosa sin grietas con algo de encogimiento

Tabla 25: Apariencia de la torta liofilizada de las composiciones de la tabla 23

20

UID	Observaciones
183-001-01-114-F1	4 de 4 viales mostraron una torta compacta y esponjosa sin grietas
183-001-01-114-F2	4 de 4 viales mostraron una torta compacta y esponjosa sin grietas
183-001-01-114-F3	2 de 4 viales mostraron una torta compacta y esponjosa sin grietas
183-001-01-114-F4	4 de 4 viales mostraron una torta compacta y esponjosa sin grietas
183-001-01-114-F5	3 de 4 viales mostraron una torta compacta y esponjosa sin grietas
183-001-01-114-F6	4 de 4 viales mostraron una torta compacta y esponjosa sin grietas

La figura 19 es un gráfico que representa el porcentaje de TBA en cada muestra reconstituida de las composiciones de la tabla 22.

5 La figura 20 es un gráfico que representa el porcentaje de TBA en cada muestra reconstituida de las composiciones de la tabla 23.

10 La figura 21 es un gráfico que muestra las distribuciones de tamaño de partículas para tres réplicas de líquidos reconstituidos para las composiciones de la tabla 23. El panel A muestra datos para 183-001-01-114-F1; el panel B muestra datos para 183-001-01-114-F4; el panel C muestra datos para 183-001-01-114-F5; y el panel D muestra datos para 183-001-01-114-F6. Un subconjunto de las composiciones de la tabla 22, concretamente 81494-F7, -F8, -F9, -F10, -F11 y -F12, formaron tortas liofilizadas de alta calidad. Cuando se reconstituyeron en agua, las seis composiciones contenían menos del 3 por ciento de TBA. Las composiciones reconstituidas de 81494-F9 y 81494-F10 contenían el porcentaje más bajo de TBA, menos del 0,5 por ciento. Estos datos indican que los constituyentes de las composiciones 81494-F7, F8, F9, F10 y F11 pueden conferir propiedades beneficiosas tanto a la torta liofilizada como a la solución reconstituida.

15 La calidad e integridad de la torta liofilizada fue elevada para todas las composiciones preparadas con el proceso de liofilización modificado (las composiciones de la tabla 23), y todas esas composiciones, cuando se reconstituyeron, tenían niveles de TBA inferiores al 0,5 por ciento. Estos resultados confirman experimentos previos que mostraron que un porcentaje más alto de manitol se correlacionó con un nivel más bajo de TBA en las composiciones reconstituidas. Sin embargo, las composiciones que comprenden manitol no presentan una distribución del tamaño de partícula tan uniforme y reproducible como la que se ha observado para las composiciones que comprenden trehalosa como único excipiente de azúcar. Por lo tanto, la trehalosa es el excipiente de azúcar preferido para las composiciones que comprenden SapC y DOPS.

20 **Ejemplo 9.** Determinación de cómo varias composiciones afectan a la estabilidad y a la pureza de las composiciones que comprenden SapC y DOPS

25 Basándose en los resultados de los ejemplos anteriores, se determinó que una composición preferida para un producto farmacéutico de SapC-DOPS era 2,2 mg/ml de SapC, 2,4 mg/ml de DOPS (relación molar de SapC:DOPS de 1:12), Tris 25 mM pH 7,2, 5 por ciento de trehalosa. Para determinar cómo la variación del pH y las concentraciones de los componentes afectan a la estabilidad y a la pureza de las composiciones que comprenden SapC y DOPS, se prepararon y se evaluaron las composiciones enumeradas en la tabla 26.

30 Procedimiento

35 Se prepararon las composiciones enumeradas en la tabla 26. Se dispusieron partes alícuotas de 4 ml en viales y se liofilizaron según el proceso de liofilización descrito en el ejemplo 6, con una modificación: el tiempo de secado secundario fue de 25 horas en lugar de 15 horas. Las tortas liofilizadas se almacenaron a 50 °C durante 4 semanas (o se almacenaron a 25 °C durante 2 o 4 semanas) antes del análisis y la reconstitución con 1,2 ml de agua HyClone™. Las propiedades siguientes se analizaron tal como se describe en el ejemplo 2: apariencia visual, pH, contenido de proteína total y pureza del contenido de proteína en las muestras reconstituidas. Las propiedades siguientes se analizaron tal como se describe en el ejemplo 6: apariencia visual de las tortas liofilizadas, porcentaje de TBA en las muestras reconstituidas y distribución del tamaño de partícula en cada muestra reconstituida.

40

Tabla 26: Composiciones, pre-liofilización

UID	Descripción
183-001-01-141-F1	2,2 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, Tris 25 mM pH 7,2, 5 por ciento de trehalosa
183-001-01-141-F2	3,4 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, Tris 25 mM pH 6,8, 7,5 por ciento trehalosa
183-001-01-141-F3	1,0 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, Tris 25 mM pH 7,6, 7,5 por ciento de trehalosa
183-001-01-141-F4	3,4 mg/ml SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, Tris 25 mM pH 7,6, 2,5 por ciento de trehalosa
183-001-01-141-F5	1,0 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, Tris 25 mM pH 6,8, 2,5 por ciento de trehalosa
183-001-01-141-F6	2,2 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, Tris 25 mM pH 7,2, 5 por ciento de trehalosa
183-001-01-141-F7	2,2 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, Tris 25 mM pH 7,2, 5 por ciento de trehalosa

ES 2 895 180 T3

UID	Descripción
183-001-01-141-F8	3,4 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, Tris 25 mM pH 7,6, 7,5 por ciento de trehalosa
183-001-01-141-F9	1,0 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, Tris 25 mM pH 7,2, 2,5 por ciento de trehalosa
183-001-01-141-F10	3,4 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, Tris 25 mM pH 6,8, 2,5 por ciento de trehalosa
183-001-01-141-F11	1,0 mg/ml de SapC, relación molar de SapC:DOPS de 1:12, Tris 25 mM pH 6,8, 7,5 por ciento de trehalosa

Resultados

5 La tabla 27 incluye observaciones cualitativas de las composiciones liofilizadas almacenadas a 50 °C durante 4 semanas y de composiciones reconstituidas preparadas a partir de las composiciones liofilizadas almacenadas y después analizadas inmediatamente. El pH de cada muestra reconstituida se indica en la tabla 28 y el porcentaje de TBA se muestra en la tabla 29.

10 Tabla 27: Apariencia de la torta liofilizada almacenada a 50 °C durante 4 semanas y apariencia del líquido reconstituido preparado a partir de la torta almacenada

UID	Torta liofilizada	Solución reconstituida
183-001-01-141-F1	Torta compacta y esponjosa sin grietas	Ligeramente turbia
183-001-01-141-F2	Torta compacta y esponjosa sin grietas	Ligeramente turbia
183-001-01-141-F3	Torta compacta y esponjosa sin grietas	Transparente
183-001-01-141-F4	Torta compacta y esponjosa sin grietas	Turbia
183-001-01-141-F5	Torta compacta y esponjosa sin grietas	Ligeramente turbia
183-001-01-141-F6	Torta compacta y esponjosa sin grietas	Ligeramente turbia
183-001-01-141-F7	Torta compacta y esponjosa sin grietas	Ligeramente turbia
183-001-01-141-F8	Torta compacta y esponjosa sin grietas	Ligeramente turbia
183-001-01-141-F9	Torta compacta y esponjosa sin grietas	Ligeramente turbia
183-001-01-141-F10	Torta compacta y esponjosa sin grietas	Turbia
183-001-01-141-F11	Torta compacta y esponjosa sin grietas	Transparente

Tabla 28: pH de cada composición reconstituida preparada después de almacenar las muestras liofilizadas durante 4 semanas

15

UID	pH
183-001-01-141-F1	7,2
183-001-01-141-F2	6,8
183-001-01-141-F3	7,6
183-001-01-141-F4	7,6
183-001-01-141-F5	6,8
183-001-01-141-F6	7,2
183-001-01-141-F7	7,2
183-001-01-141-F8	7,6
183-001-01-141-F9	7,6
183-001-01-141-F10	6,8
183-001-01-141-F11	6,8

Tabla 29: Porcentaje de TBA en cada composición reconstituida preparada después de almacenar las muestras liofilizadas durante 4 semanas

UID	Porcentaje TBA
183-001-01-141-F1	1,85
183-001-01-141-F2	1,94
183-001-01-141-F3	1,81
183-001-01-141-F4	1,58
183-001-01-141-F5	1,62
183-001-01-141-F6	1,78
183-001-01-141-F7	1,74
183-001-01-141-F8	1,92
183-001-01-141-F9	1,38
183-001-01-141-F10	1,44
183-001-01-141-F11	1,79

5 La figura 22 es un gráfico que representa las mediciones RP-HPLC de pureza de SapC en cada composición reconstituida preparada a partir de polvo liofilizado que se había almacenado a 25 °C durante 2 o 4 semanas. La figura 23 es un gráfico que representa las mediciones IEX-HPLC de pureza de SapC en cada composición reconstituida preparada a partir de polvo liofilizado que se había almacenado a 25 °C durante 2 o 4 semanas.

10 La figura 24 es un gráfico que representa el tamaño medio de partícula a lo largo del tiempo en cada composición reconstituida preparada a partir de polvo liofilizado que se había almacenado a 25 °C durante 2 o 4 semanas.

Los datos anteriores con respecto a las composiciones de la tabla 26 indican:

15 (1) tortas liofilizadas de todas las composiciones reconstituidas casi inmediatamente después de la adición del diluyente;

(2) la apariencia de todas las composiciones liofilizadas permaneció sin cambios después de 4 semanas de almacenamiento a 50 °C;

20 (3) la apariencia de los productos reconstituidos mostró que una composición que contenía 2,2 mg/ml de SapC, DOPS en una cantidad que producía una relación molar de SapC:DOPS de 1:12, Tris 25 mM pH 7,2 y trehalosa al 5 por ciento (la composición preferida) tenía una turbidez aceptablemente baja;

25 (4) el pH permaneció estable en todas las composiciones reconstituidas mantenidas a 50 °C durante 2 o 4 semanas;

(5) las composiciones reconstituidas con menor porcentaje de trehalosa tenían menor porcentaje de TBA;

30 (6) el TBA residual promedio de la composición preferida (n = 3; F1, F6 y F7) después de la reconstitución fue del 1,8 por ciento;

(7) las composiciones con un porcentaje más alto de trehalosa mostraron un tamaño de partícula promedio más bajo y composiciones.

35 Basándose en todos los datos de los ejemplos 1-9, una composición que comprende una relación molar de lípido fosfatidilserina con respecto a polipéptido en el intervalo de 8:1 a 20:1, tampón Tris, trehalosa y TBA proporcionó las propiedades físicas y químicas preferidas de una composición clínica.

40 **Ejemplo 10.** Evaluación de la actividad de composiciones que comprenden SapC y DOPS

Se sabe que la saposina C, en presencia de un fosfolípido aniónico (DOPS), activa la enzima glucocerebrosidasa (GBA) para catalizar la hidrólisis de cerebrósido para dar ceremida y glucosa. Para analizar esta función del compuesto SapC-DOPS *in vitro*, se utiliza la enzima GBA humana recombinante (R&D Systems, N° de cat.: 7410-GHB-020) y, en lugar de cerebrósido, se utiliza 4-metilumbeliferil-β-D-glucopiranosido, o 4-MUG, (Sigma, N° de cat.: M3633) como sustrato. SapC-DOPS activará rhGBA para escindir 4-MUG en 4-metilumbeliferona (4-MU), que emite una señal fluorescente, y glucosa.

En el ejemplo siguiente, se encontró que la muestra de control positivo tenía una potencia relativa del 102% del patrón de referencia (REF). (Un resultado de aprobación de este ensayo es del 70-160% de potencia relativa). También se analizó una muestra de especificidad (SPEC) para mostrar una actividad disminuida si la SapC está dañada de alguna manera. La muestra de SPEC contenía SapC tratada a 70 °C durante 48 horas, después combinada con DOPS. No se pudo determinar la potencia relativa para la muestra SPEC porque se considera que las curvas son diferentes. Sin embargo, la parte superior de la curva de mejor ajuste de la muestra SPEC fue el 79% de la parte superior de la curva de mejor ajuste de la muestra REF. Un resultado de aprobación para la especificidad es < 90%. Además, se utilizaron controles que incluyen diferentes combinaciones de algunos, pero no todos, los componentes críticos del ensayo. Entre estos se destacan: enzima más sustrato sin SapC-DOPS (GBA + 4MU), enzima más sustrato más DOPS, sin SapC (solo DOPS) y enzima más sustrato más SapC sin DOPS (solo SapC). Ninguno de estos controles produjo una señal fluorescente significativa, lo que demuestra que se necesitan tanto SapC como DOPS para activar la enzima para escindir el sustrato.

La figura 25 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo enzimático de GBA que analiza la actividad de SapC-DOPS.

Ejemplo 11. Protocolo de tratamiento con una composición farmacéutica que comprende SapC y DOPS.

Se inscribieron pacientes de 18 años de edad o mayores con tumores sólidos avanzados o gliomas de alto grado (HGG) recurrentes en un ensayo clínico de fase 1, de etiqueta abierta y escalada de dosis de una composición de SapC/DOPS denominada BXQ-350. El producto BXQ-350 liofilizado (suministrado como un polvo liofilizado en un vial) se reconstituye con agua estéril para inyección para producir una solución acuosa que contiene SapC humana a 2,2 mg/ml (+/- 0,3 mg/ml); la sal sódica de DOPS a 2,4 mg/ml (+/- 0,4 mg/ml); Tris 25 mM (+/- 2 mM), pH 7,2 (+/- 0,4); trehalosa al 5 por ciento p/v (+/- 1 por ciento). Si hay presencia de alcohol t-butílico, es inferior al 2 por ciento p/p.

Después de un estudio de escalada de dosis, se seleccionó una dosis de BXQ-350 que suministra 2,4 mg de SapC por kg de peso corporal para un estudio adicional. El protocolo de administración incluye al menos un ciclo de tratamiento. El tratamiento puede continuar durante seis ciclos de tratamiento o hasta la progresión de la enfermedad, tal como se describe, por ejemplo, en la tabla 30. BXQ-350 se suministra como un polvo liofilizado en viales de vidrio. Antes de la administración, el producto farmacéutico sólido se reconstituye en los viales añadiendo al vial 4 ml de agua estéril para inyección, USP, lo que da como resultado una concentración del medicamento reconstituido de 2,2 mg/ml de SapC en el vial. El medicamento reconstituido se diluye después a la concentración de administración intravenosa objetivo en solución salina estéril al 0,9% en bolsas IV. Cada dosis se administra por infusión IV a lo largo de un periodo de tiempo de aproximadamente 45 minutos ± 15 minutos.

Tabla 30: Programa de administración

Programa de administración de BXQ-350			
Ciclo 1 - Semana 1	Ciclo 1 - Semana 2	Ciclo 1 - Semanas 3 y 4	Ciclos 2-6
Días 1-5 (5 días consecutivos)	Días 8, 10 y 12 (días alternos)	Días 15 y 22 (una vez cada 7 + 3 días)	Días 29, 57, 85, 113 y 141 (una vez cada 28 ± 3 días)

La figura 26 es una tabla que muestra los datos demográficos y los eventos adversos de la fase 1a por grupo de dosificación. No se notificaron eventos adversos graves relacionados con el tratamiento.

La PK/TK preclínica se escaló alométricamente para predecir la PK humana y la exposición (área bajo curva (AUC)) a dosis terapéuticas de 0,7 a 2,4 mg/kg. El aclaramiento humano, el volumen terminal de distribución (Vz), la semivida y el AUC (a dosis de 0,7 - 2,4 mg/kg) del primer ensayo en seres humanos (FIH) se resumen a continuación: aclaramiento (Cl) 57-76 ml/kg/h, Vz 314-509 ml/kg, y semivida 3,5-5 h. Las AUC correspondientes variaron de 10.020 a 42.330 h * ng/ml. La eficacia se produjo típicamente en modelos murinos a dosis de 4-16 mg/kg y las AUC correspondientes de 7.400-29.600 h * ng/ml. Según los datos de ratón, las exposiciones FIH se encuentran dentro del intervalo de exposición deseado. Las figuras 27A-C son tres conjuntos de gráficos que ilustran los resultados farmacocinéticos del día 1 (figura 27A), día 4 (figura 27B) y día 22 (figura 27C) del ensayo de fase 1. Los datos se presentan como una gráfica semilogarítmica (parte superior de cada conjunto). La farmacocinética fue proporcional a la dosis.

La figura 29 es un gráfico *swimmer plot* que ilustra los resultados de los pacientes en el ensayo de fase 1a. Algunos de los sujetos individuales se analizan a continuación en los ejemplos 12-14.

Ejemplo 12. Uso de una composición farmacéutica que comprende SapC y DOPS para tratar a un paciente al que se ha diagnosticado ependimoma anaplásico parietal

Procedimientos

Los ependimomas son tumores primarios raros del sistema nervioso que representan aproximadamente el 3% de los tumores cerebrales en adultos en Estados Unidos. El patrón de atención incluye resección quirúrgica máxima y radioterapia. No existe ningún tratamiento con fármacos aprobado por la FDA.

A un hombre blanco de 67 años de edad con antecedentes de cáncer de próstata se le diagnosticó en octubre de 2014 un ependimoma anaplásico parietal izquierdo. Se sometió a una resección total macroscópica, seguida de radiación adyuvante. La imagen de resonancia magnética cerebral repetida en abril de 2017 mostró una recurrencia local. Recibió 3 ciclos de temolozomida sin respuesta. Se inscribió en el ensayo BXQ-350 en septiembre de 2017; en el momento de la inscripción su estado funcional del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) era 1 y sus síntomas principales eran afasia y debilidad del lado derecho. El paciente recibió el ciclo 1 (BXQ-350 2,4 mg/kg en infusión IV los días 1-5, 8, 10, 12, 15, 22) y 3 ciclos adicionales (1 x 28 días), y se siguió hasta la muerte para determinar seguridad, respuesta, evaluación revisada en neuro-oncología (RANO) y estado funcional ECOG.

Resultados

Al inicio del estudio, la lesión temporal fue de 6,4 x 3,2 cm, asociada con invasión del cráneo y el cuero cabelludo. Después de 2 ciclos, se notificó una disminución menor en el tamaño de los componentes potenciadores intracraneales (enfermedad estable general por RANO). El paciente recibió 4 ciclos totales de BXQ-350 sin efectos adversos ni toxicidades relacionadas. El ciclo 5 se suspendió debido a la progresión del volumen en la resonancia magnética. Murió 6 meses después de la inscripción, debido al efecto de la masa del tumor cerebral. La histología *post-mortem* y la anatomía macroscópica mostraron una necrosis del tumor cerebral extensa con diferenciación condroide y signos de enfermedad necrótica en la columna torácica y lumbar en el microscopio. La necrosis del tumor cerebral observada en la autopsia parecía estar relacionada con el tratamiento y es una indicación de que el fármaco era tóxico para las células tumorales.

Las figuras 28A-D representan resultados de histología *post-mortem* y análisis de anatomía macroscópica; de izquierda a derecha: (A) El espécimen quirúrgico inicial mostró poca evidencia de diferenciación ependimaria y abundantes figuras mitóticas. H&E a 40x; (B) El examen macroscópico del cerebro en la autopsia mostró una necrosis del tumor extensa; (C) El examen microscópico de secciones del tumor muestra necrosis y poco tumor viable (H&E a 4x con inserto a 40x); (D) En la autopsia hubo una amplia diferenciación condroide en el sitio donde el tumor se extendía a través del defecto quirúrgico y el cuero cabelludo.

Ejemplo 13. Uso de una composición farmacéutica que comprende SapC y DOPS para tratar pacientes a los que se ha diagnosticados glioma de alto grado

Se incluyeron nueve pacientes adultos con glioma de alto grado (HGG) en un ensayo de escalada de dosis destinado a estudiar la seguridad de BXQ-350. Las dosis, administradas en ciclos según el protocolo de la tabla 30, variaron de 0,7 mg/kg a 2,4 mg/kg. Ocho de los nueve pacientes con HGG completaron un conjunto completo de ciclos antes de su retirada del estudio (siete debido a la progresión; un abandono voluntario).

Un paciente con GBM que completó más de seis ciclos (> 12 meses) de tratamiento con dosis a partir de 0,7 mg/kg presentó enfermedad estable, una disminución en el tamaño de la lesión y ningún déficit neurológico funcional progresivo significativo. Seis de los pacientes con HGG habían mejorado RANO/RECIST el día 113.

Ejemplo 14. Uso de una composición farmacéutica que comprende SapC y DOPS para tratar a un paciente al que se ha diagnosticado adenocarcinoma del apéndice

Una mujer de 62 años de edad con adenocarcinoma mucinoso localmente avanzado del apéndice fue tratada como parte del ensayo de fase 1a. Después de la resección y la quimioterapia adyuvante posoperatoria (FOLFOX), una recurrencia en la pelvis en 2007 que involucró a los ovarios condujo a una cirugía citorrreductora que incluyó histerectomía abdominal total/salpingo-ooforectomía bilateral seguida de tratamiento sistémico con irinotecán y cetuximab. En 2009, la recurrencia condujo a una cirugía citorrreductora extensa y perfusión hipertérmica intraabdominal, con remisión completa. Después de rechazar el tratamiento para recurrencia en 2016, comenzó con BXQ-350 en julio de 2017. Se le administraron 2,4 mg/kg de BXQ-350 por vía intravenosa, según el protocolo de la fase 1 y experimentó una respuesta parcial, permaneciendo en el estudio en el ensayo de la fase 1b después de completar 11 ciclos y sin eventos adversos graves atribuibles a BXQ-350.

Ejemplo 15. Uso de una composición farmacéutica que comprende SapC y DOPS para tratar pacientes a los que se ha diagnosticado adenocarcinoma de recto

Se incluyó a pacientes adultos con varios tumores sólidos en un ensayo de escalada de dosis destinado a estudiar la seguridad de BXQ-350. Las dosis, administradas en ciclos según el protocolo de la tabla 30, variaron de 0,7 mg/kg a 2,4 mg/kg. Todos los pacientes completaron al menos un ciclo antes de la retirada.

Un paciente al que se ha diagnosticado adenocarcinoma de recto metastásico (estadio IV) completó más de 12 meses de tratamiento con dosis que comenzaron con 1,8 mg/kg y presentó enfermedad estable, con evidencia de una disminución significativa de la actividad metabólica del tumor mediante tomografía por emisión de positrones (PET), utilizando flúorodesoxiglucosa. (F-18 FDG) después de más de 12 meses de tratamiento. Véanse las figuras 30A y 30B.

5

Listado de secuencias

<110> Bexion Pharmaceuticals Inc.

10

<120> Composiciones farmacéuticas de saposina C y procedimientos de tratamiento de cáncer

<130> 47144-0002WO1

15

<150> US 62/678,668

<151> 2018-05-31

<150> US 62/647,058

<151> 23/03/2018

20

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

25

<210> 1

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 1

Ser Asp Val Tyr Cys Glu Val Cys Glu Phe Leu Val Lys Glu Val Thr
1 5 10 15

Lys Leu Ile Asp Asn Asn Lys Thr Glu Lys Glu Ile Leu Asp Ala Phe
20 25 30

Asp Lys Met Cys Ser Lys Leu Pro Lys Ser Leu Ser Glu Glu Cys Gln
35 40 45

Glu Val Val Asp Thr Tyr Gly Ser Ser Ile Leu Ser Ile Leu Leu Glu
50 55 60

Glu Val Ser Pro Glu Leu Val Cys Ser Met Leu His Leu Cys Ser Gly
65 70 75 80

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

5 un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con de cero a cuatro inserciones, sustituciones o deleciones de aminoácidos;

un lípido fosfatidilserina;

10 un tampón a un pH de 5,0 a 8,0;

trehalosa a del 1,5 al 9 por ciento p/p;

15 alcohol t-butílico a del 0 al 35 por ciento; y

agua,

en la que el polipéptido se encuentra a una concentración de 0,4 a 5,0 mg/ml, y la relación molar del lípido fosfatidilserina con respecto al polipéptido se encuentra en el intervalo de 8:1 a 20:1.

20 2. La composición de la reivindicación 1, en la que el tampón es tris(hidroximetil)aminometano (Tris) a una concentración de 10 a 50 mM, y el pH de la composición es de 6,8 a 7,6, o en la que el tampón es tampón de citrato a una concentración de 10 a 50 mM, o en la que el tampón es tampón de acetato a una concentración de 10 a 50 mM

25 3. La composición de la reivindicación 1, en la que

el polipéptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y se encuentra a una concentración de 1,9 a 2,5 mg/ml;

30 el lípido fosfatidilserina es DOPS y se encuentra a una concentración de 2,0 a 2,8 mg/ml;

el tampón es Tris a una concentración de 23 a 27 mM;

la trehalosa se encuentra a una concentración del 4 al 6 por ciento p/p;

35 el pH de la composición se encuentra en el intervalo de pH de 6,8 a 7,6; y

la composición comprende además alcohol t-butílico a una concentración de aproximadamente el 15 al 25 por ciento p/p.

40 4. Una composición en forma sólida que comprende:

un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con de cero a cuatro inserciones, sustituciones o deleciones de aminoácidos;

45 un lípido fosfatidilserina;

un tampón; y

50 trehalosa al 75 al 90 por ciento p/p,

en la que el polipéptido se encuentra a una concentración del 3,2 al 4,4 por ciento p/p, y la relación molar de lípido fosfatidilserina con respecto a polipéptido se encuentra en el intervalo de 8:1 a 20:1.

55 5. La composición de la reivindicación 4, en la que el tampón es Tris a del 5,6% al 7,6% p/p, o en el que el tampón es tampón de citrato a del 9% al 13% p/p, o en el que el tampón es tampón de acetato a del 3% al 5% p/p.

6. La composición de la reivindicación 4, en la que

60 el polipéptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y se encuentra a una concentración del 3,3 al 4,3 por ciento p/p;

el lípido fosfatidilserina es DOPS y se encuentra a una concentración del 3,4 al 4,8 por ciento p/p;

el tampón es Tris y se encuentra a una concentración del 6,0 al 7,2 por ciento p/p;

65 la trehalosa se encuentra a una concentración del 81 al 87,3 por ciento p/p; y

la composición comprende además alcohol t-butílico a una concentración inferior al 3 por ciento p/p.

7. Una composición farmacéutica que comprende:

un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con de cero a cuatro inserciones, sustituciones o deleciones de aminoácidos;

un lípido fosfatidilserina;

un tampón a un pH de 5,0 a 8;

trehalosa a del 1,5 al 9 por ciento p/v; y

agua,

en la que el polipéptido se encuentra a una concentración de 0,4 a 5 mg/ml, y la relación molar de lípido fosfatidilserina con respecto a polipéptido se encuentra en el intervalo de 8:1 a 20:1.

8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que el tampón es Tris a una concentración de 10 a 50 mM y el pH de la composición es de 6,8 a 7,6, o en la que el tampón es tampón de citrato a una concentración de 10 a 50 mM, o en la que el tampón es tampón de acetato a una concentración de 10 a 50 mM.

9. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 4 o la composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que el lípido fosfatidilserina es DOPS.

10. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 4 o la composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que el lípido fosfatidilserina comprende uno o más de DOPS, lípido dihexanoilfosfatidilserina, lípido dioctanoilfosfatidilserina, lípido didecanoilfosfatidilserina, lípido dilauroilfosfatidilserina, lípido dimirostoilfosfatidilserina, lípido dipalmitoilfosfatidilserina, lípido palmitoil-oleoilfosfatidilserina, lípido 1-estearoil-2-oleoilfosfatidilserina o lípido difitanoilfosfatidilserina.

11. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 4 o la composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la secuencia de aminoácidos del polipéptido comprende la SEQ ID NO: 1 con una o dos inserciones, sustituciones o deleciones de aminoácidos, o en la que la secuencia de aminoácidos del polipéptido comprende la SEQ ID NO: 1, o en la que la secuencia de aminoácidos del polipéptido consiste en SEQ ID NO: 1.

12. La composición de la reivindicación 4 o la composición farmacéutica de la reivindicación 7, que comprende además alcohol t-butílico en una cantidad inferior al 3 por ciento.

13. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que

el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y se encuentra a una concentración de 1,9 a 2,5 mg/ml;

el lípido fosfatidilserina es DOPS y se encuentra a una concentración de 2,0 a 2,8 mg/ml;

el tampón es Tris y se encuentra a una concentración de 23 a 27 mM;

la trehalosa se encuentra a una concentración del 4 al 6 por ciento p/p;

el pH de la composición se encuentra en el intervalo de pH 6,8 a 7,6; y

la composición comprende además alcohol t-butílico en una cantidad inferior al 0,5 por ciento p/p.

14. Una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de tratamiento de cáncer en un paciente humano, comprendiendo el procedimiento administrar la composición farmacéutica de la reivindicación 7 al paciente.

15. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 14, en la que el paciente tiene un tumor sólido, opcionalmente en la que el tumor sólido es un glioma o ependimoma o cáncer gastrointestinal.

16. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 14, en la que la composición se administra por vía intravenosa a una dosis que varía de 0,4 mg/kg a 7 mg/kg de SapC, y la relación de SapC con respecto a DOPS en la composición se encuentra en el intervalo de 1:8 a 1:20,

opcionalmente, en la que la composición se administra repetidamente al paciente a lo largo de al menos dos ciclos, de la forma siguiente:

Ciclo 1:

5

semana 1: una dosis en cada uno de los días 1-5;

semana 2: tres dosis en días alternos;

10

semanas 3 y 4: una dosis por semana (cada 7 (+/- 3) días);

Ciclo 2: una dosis durante la semana 5,

15

que comprende además opcionalmente al menos un ciclo posterior, en el que el, al menos un, ciclo posterior comprende: una dosis 28 (+/- 3) días después de la dosis anterior más reciente.

20

17. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 16, en la que la composición se administra por vía intravenosa a una dosis de 2,3-2,5 mg/kg de SapC y la relación de SapC con respecto a DOPS en la composición se encuentra en el intervalo de 1:11 a 1:13.

25

18. Una composición para su uso en un procedimiento de tratamiento de cáncer en un paciente humano, comprendiendo el procedimiento reconstituir la composición de la reivindicación 4 en agua o solución salina para producir una composición reconstituida y administrar por vía intravenosa una dosis de la composición reconstituida al paciente.

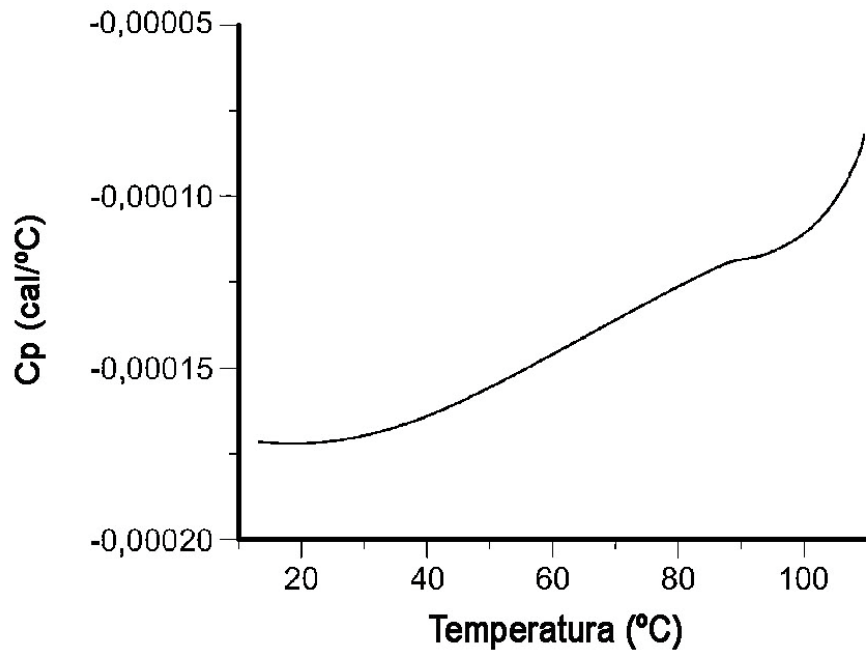


FIG. 1

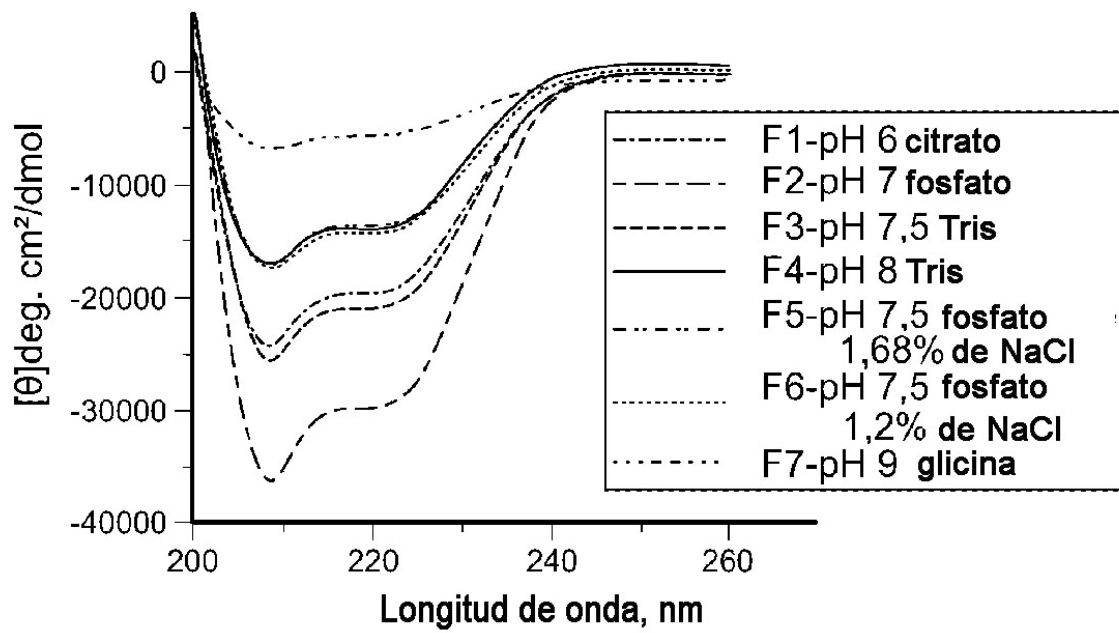


FIG. 2

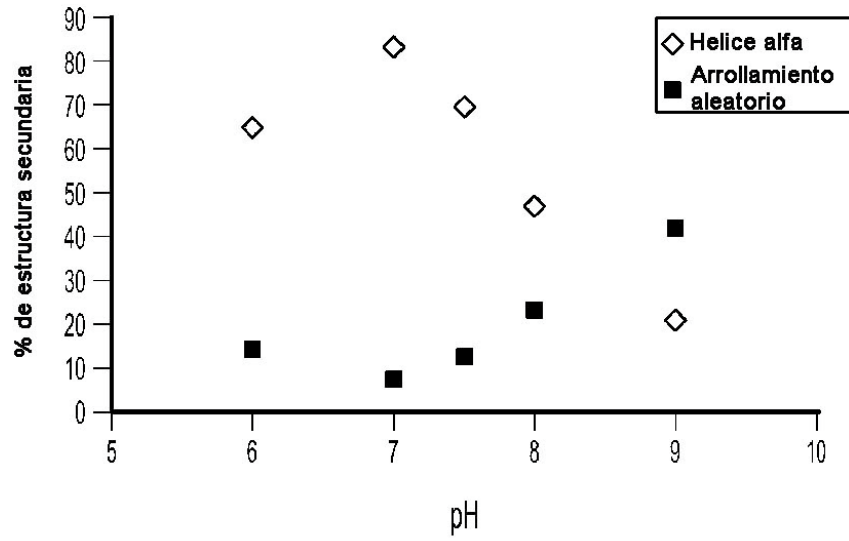


FIG. 3

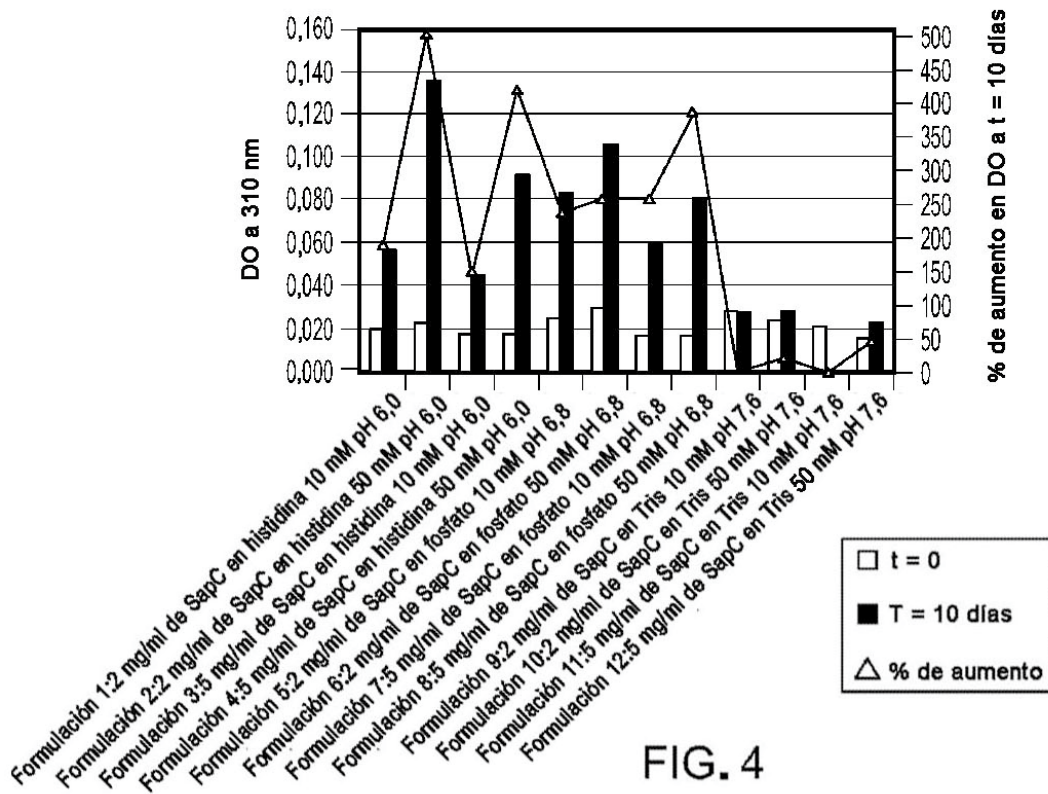


FIG. 4

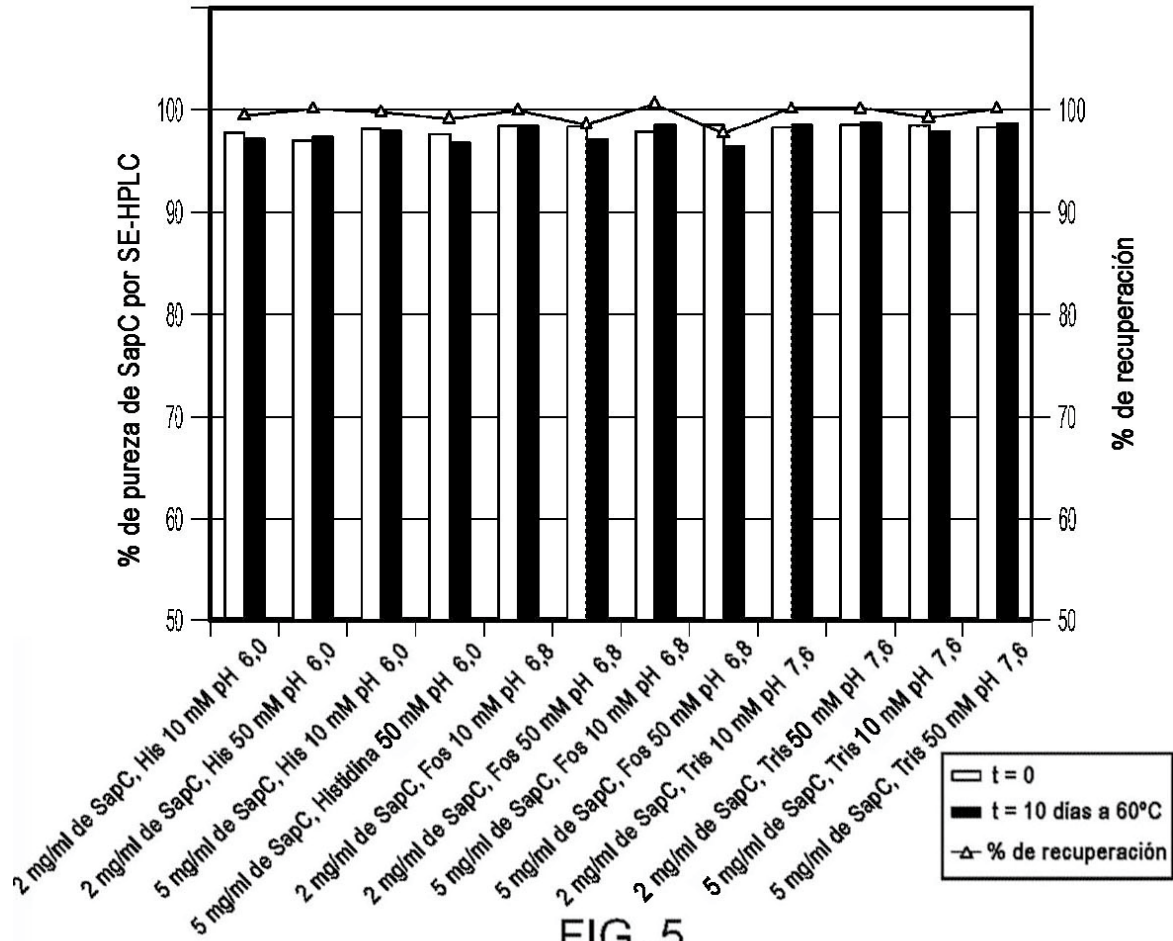


FIG. 5

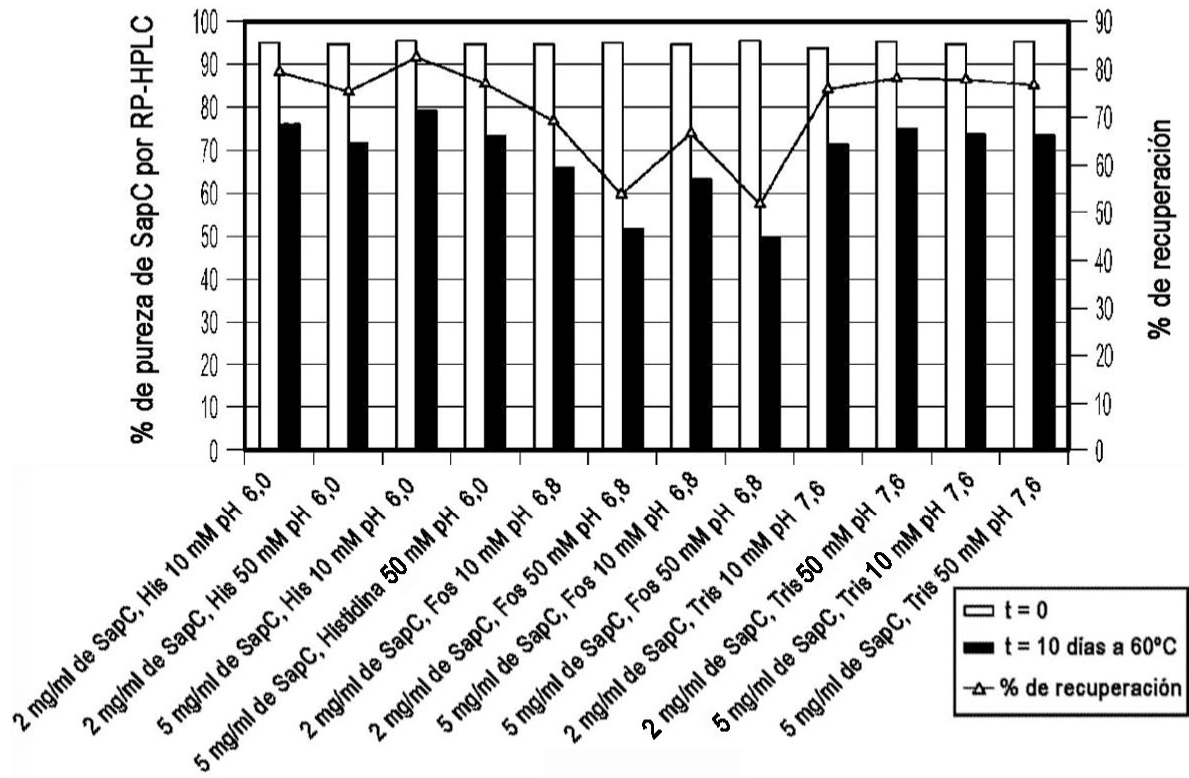


FIG. 6

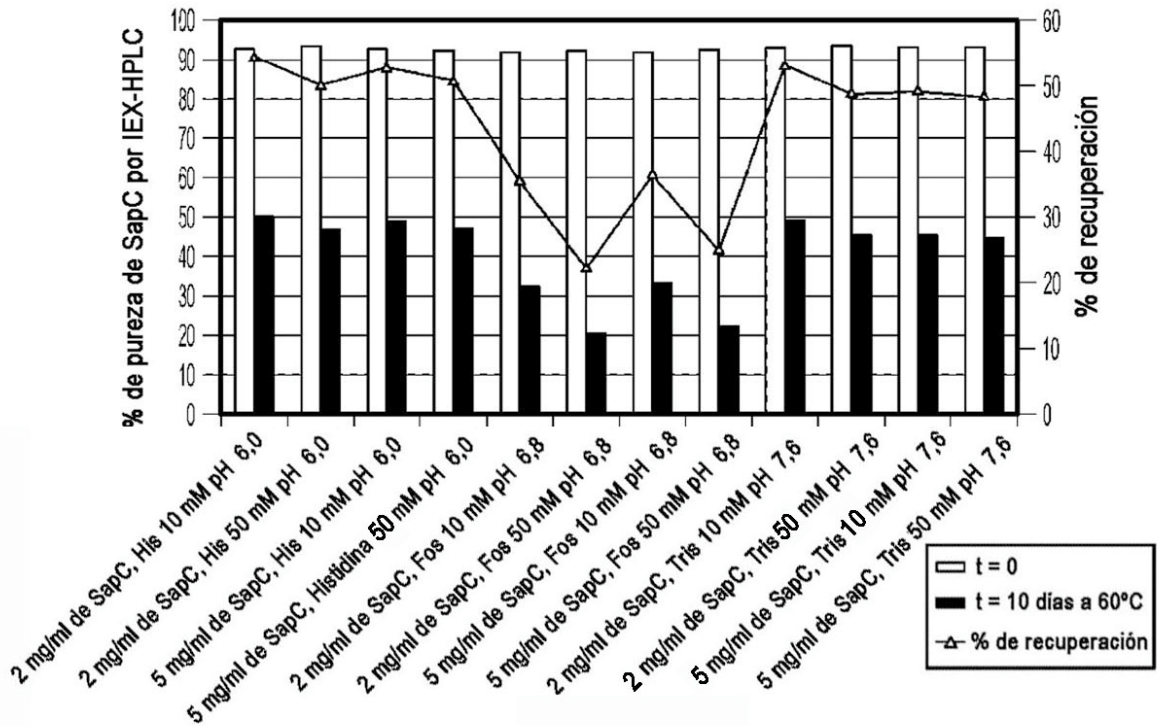


FIG. 7

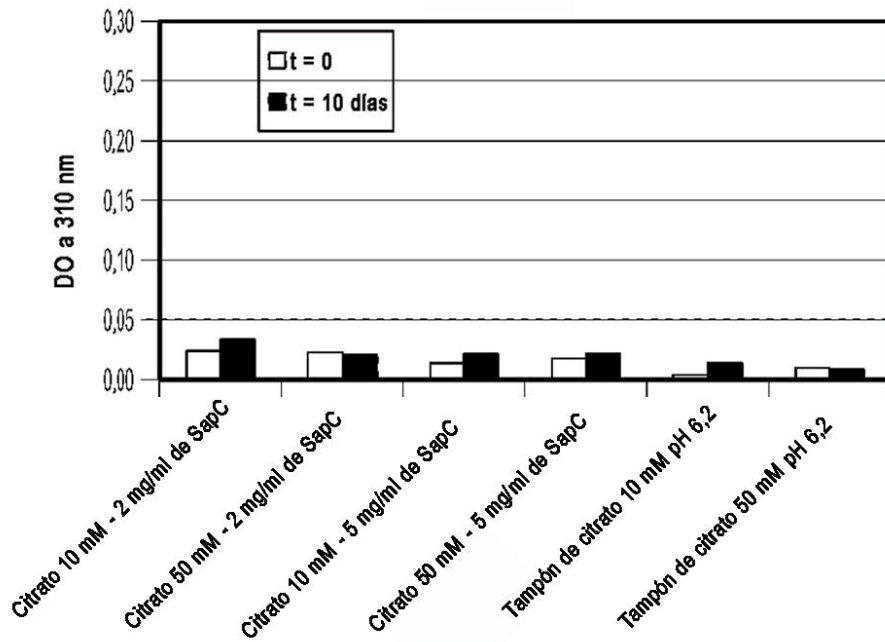


FIG. 8

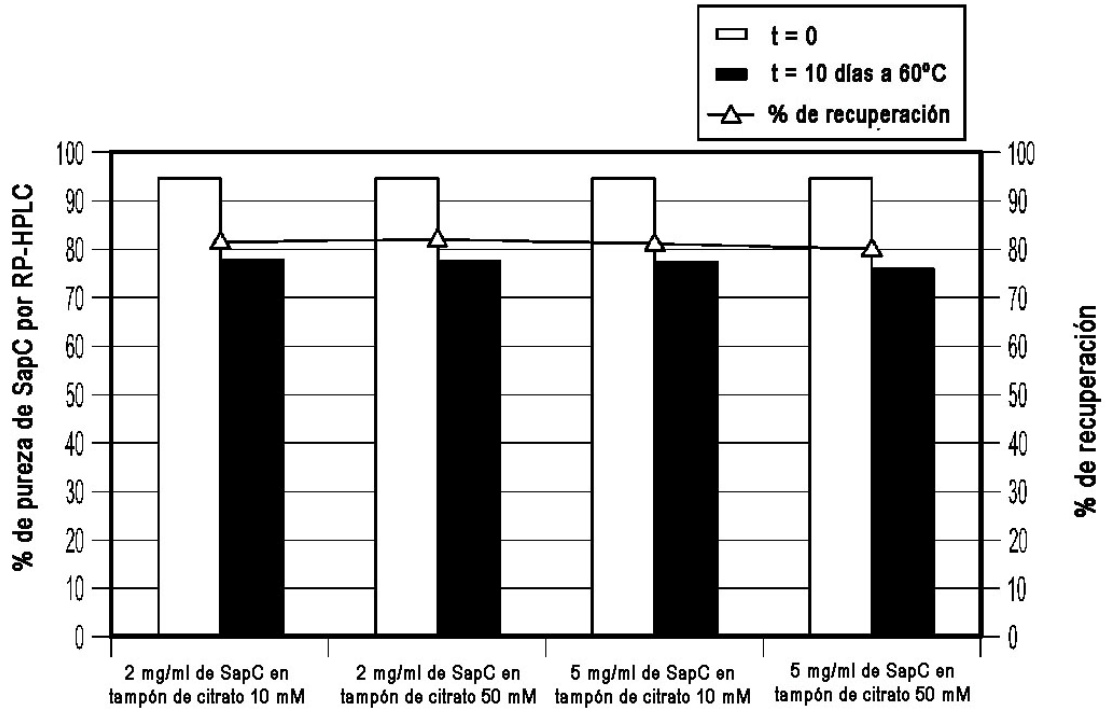


FIG. 9

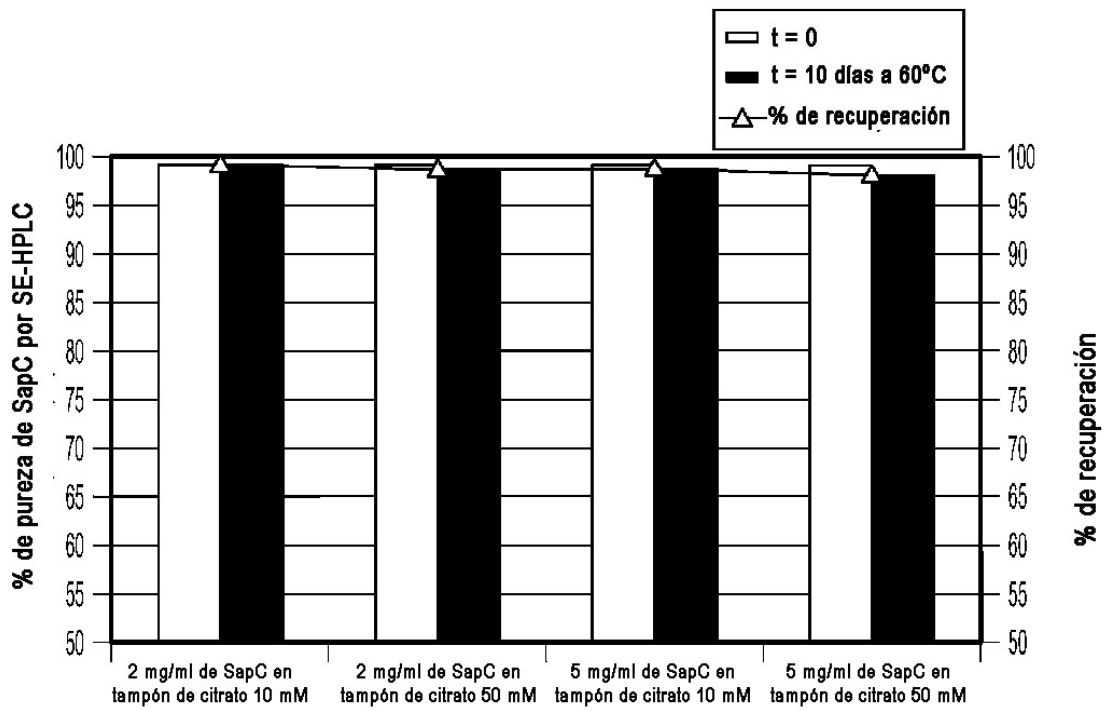


FIG. 10

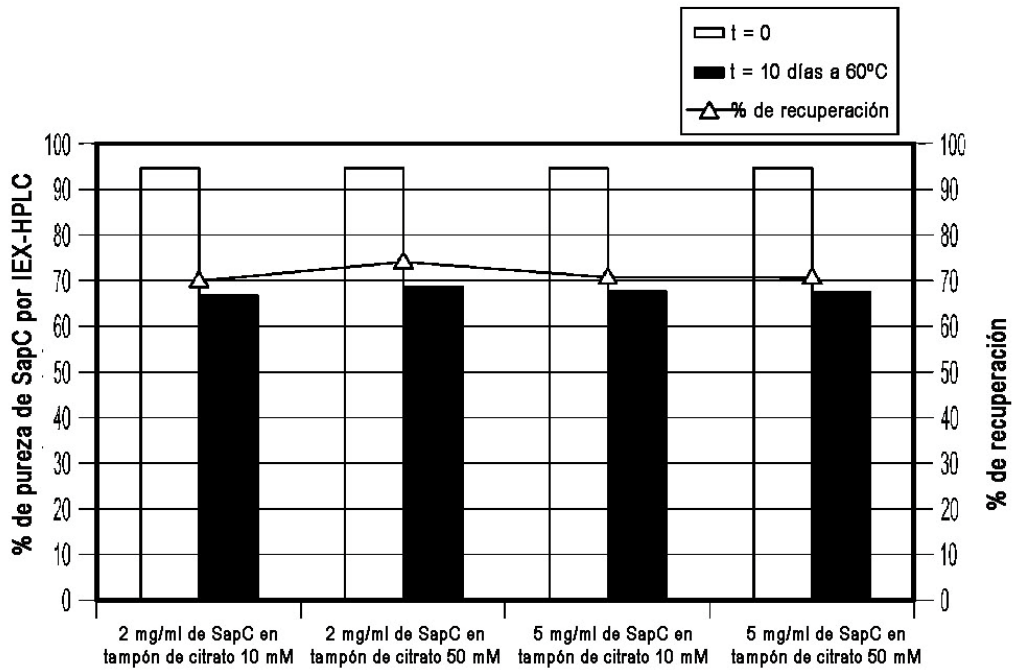


FIG. 11

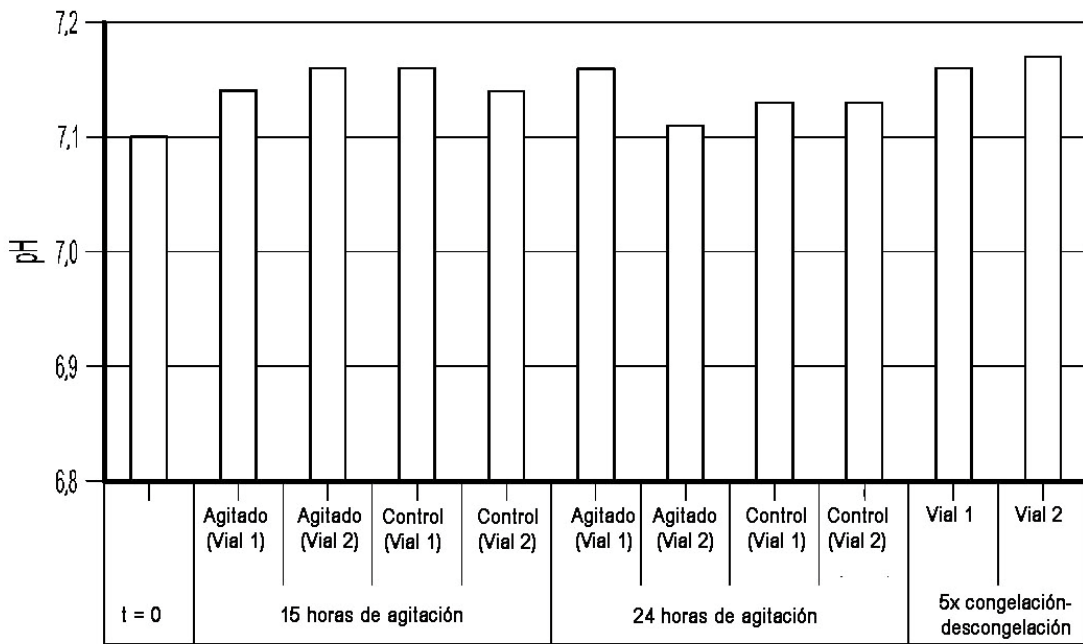


FIG. 12

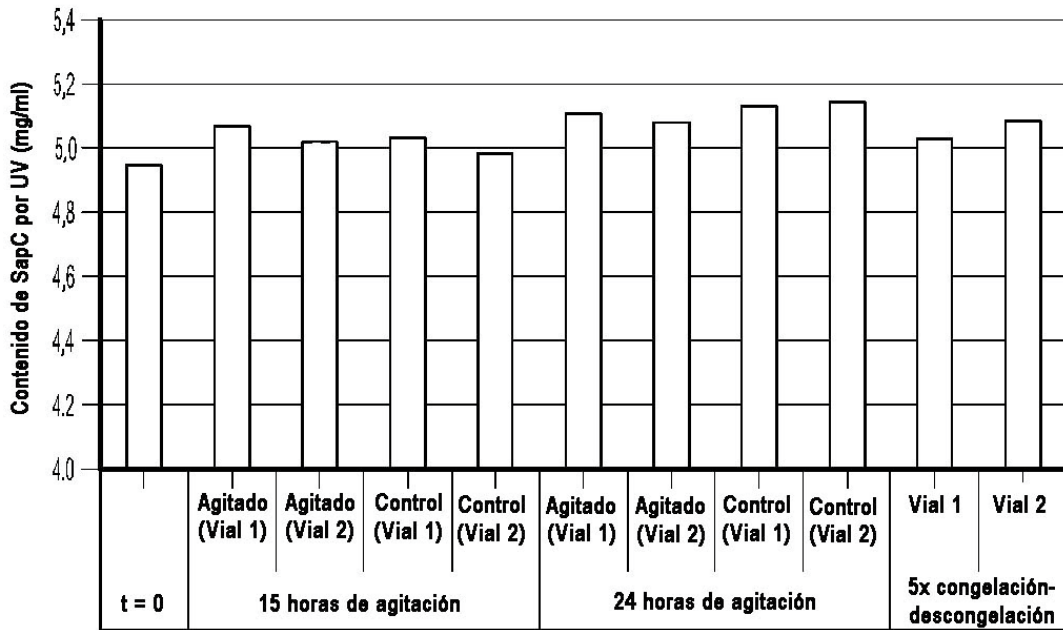


FIG. 13

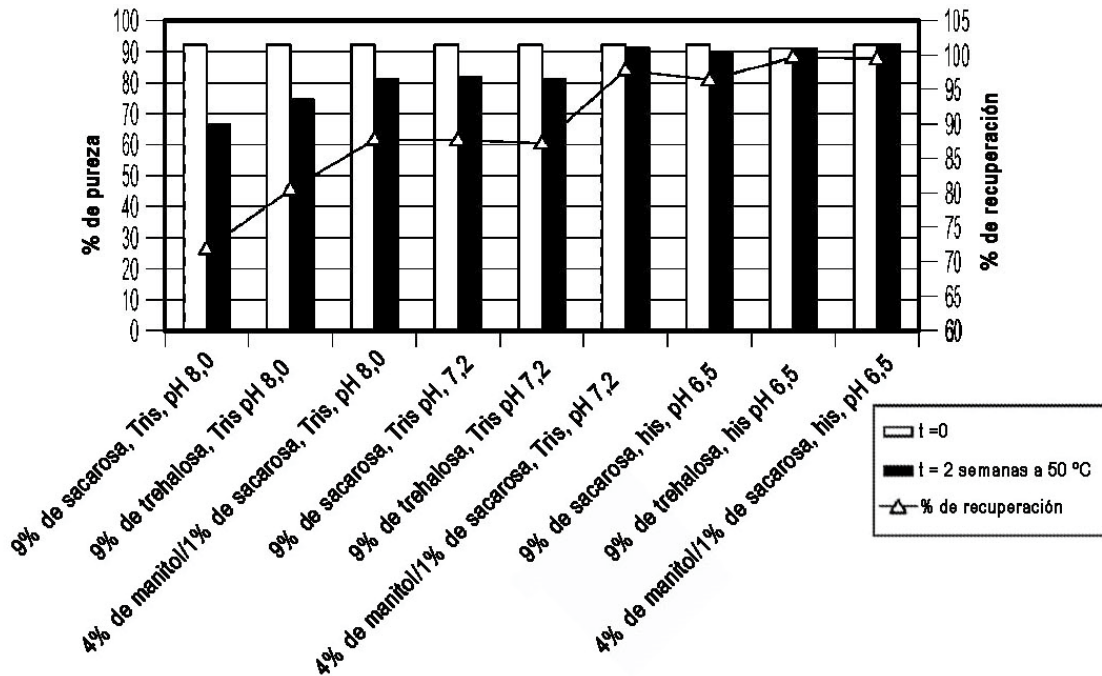
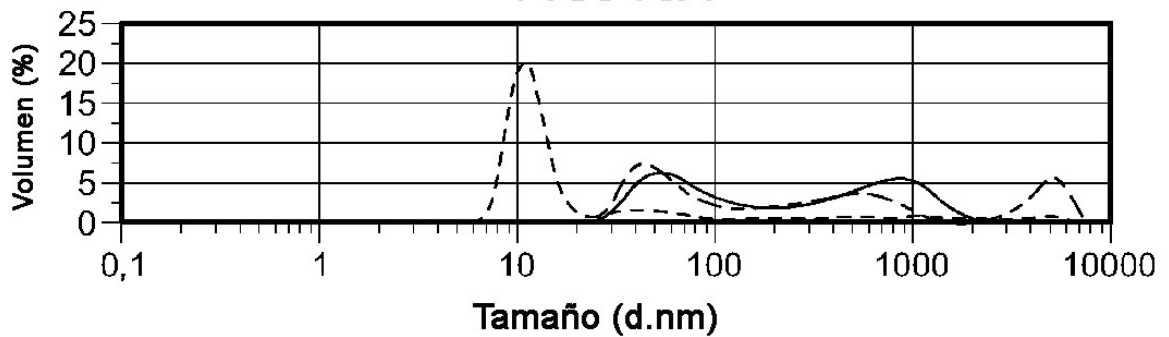
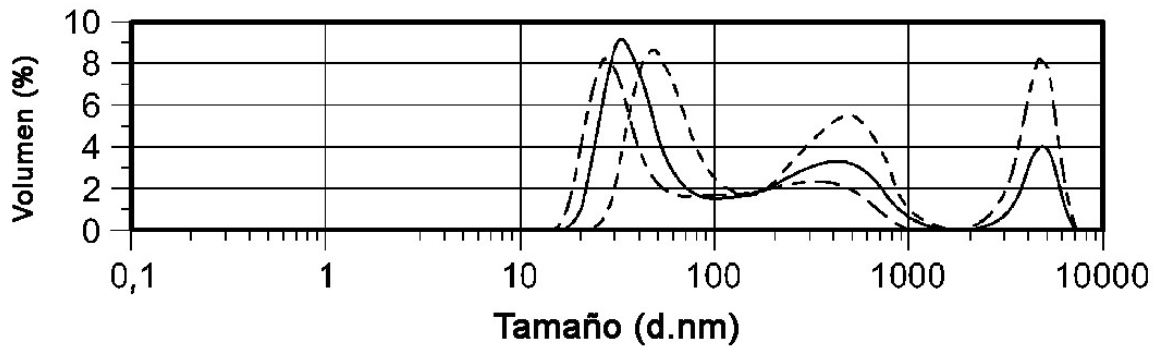
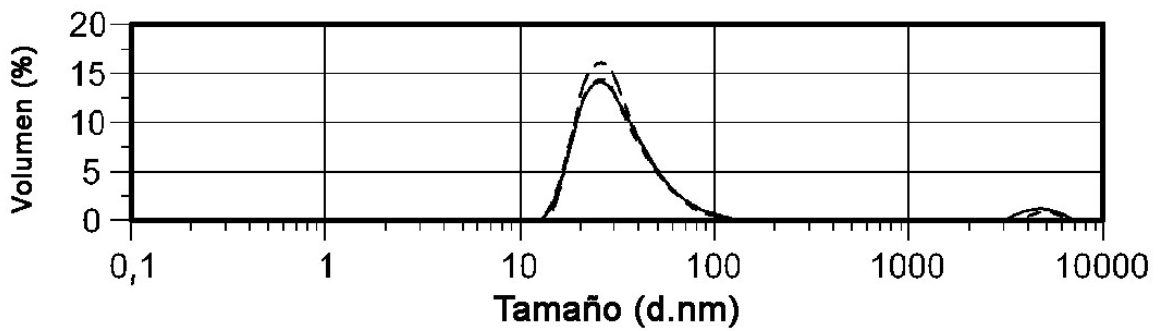
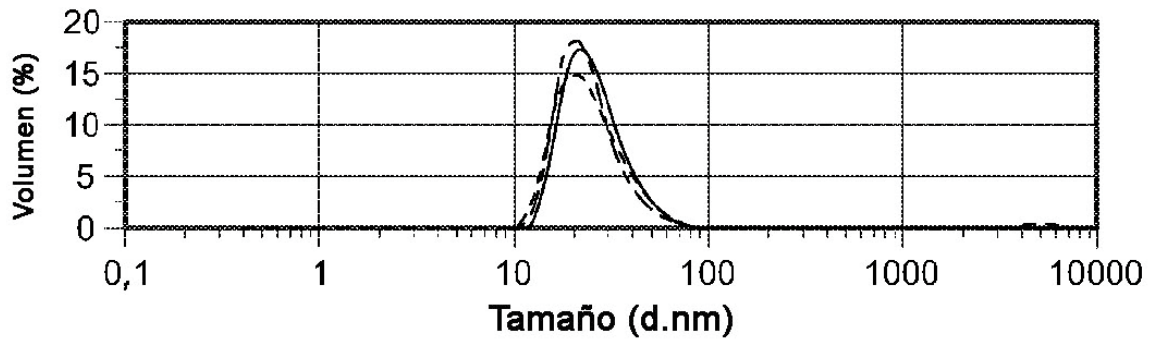


FIG. 14



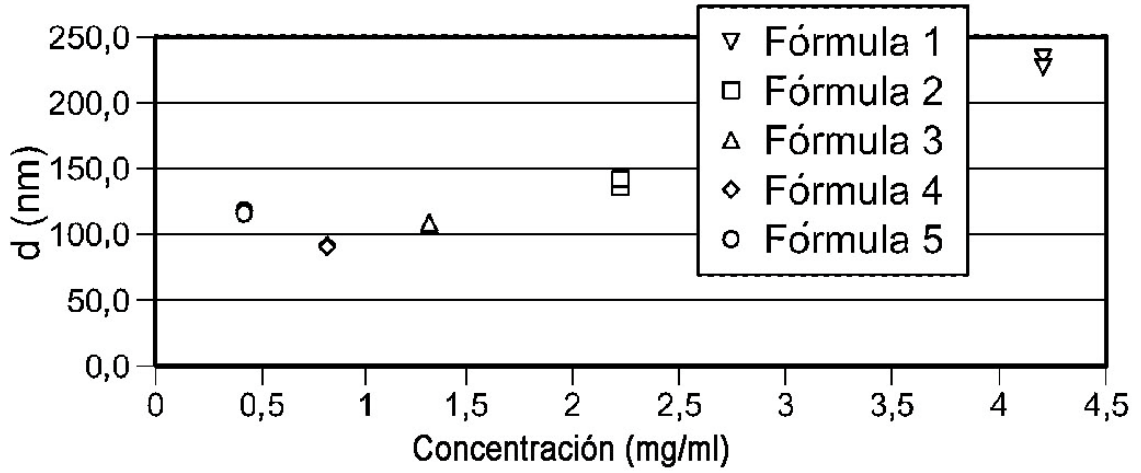


FIG. 17

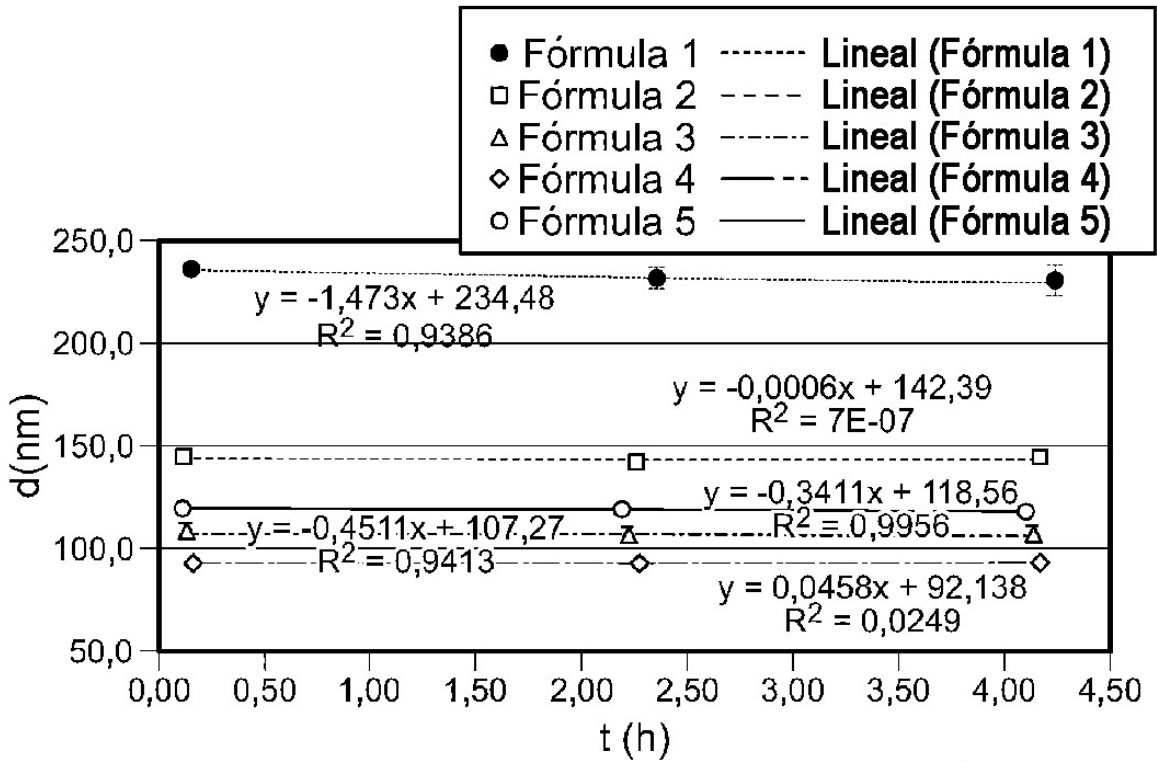


FIG. 18

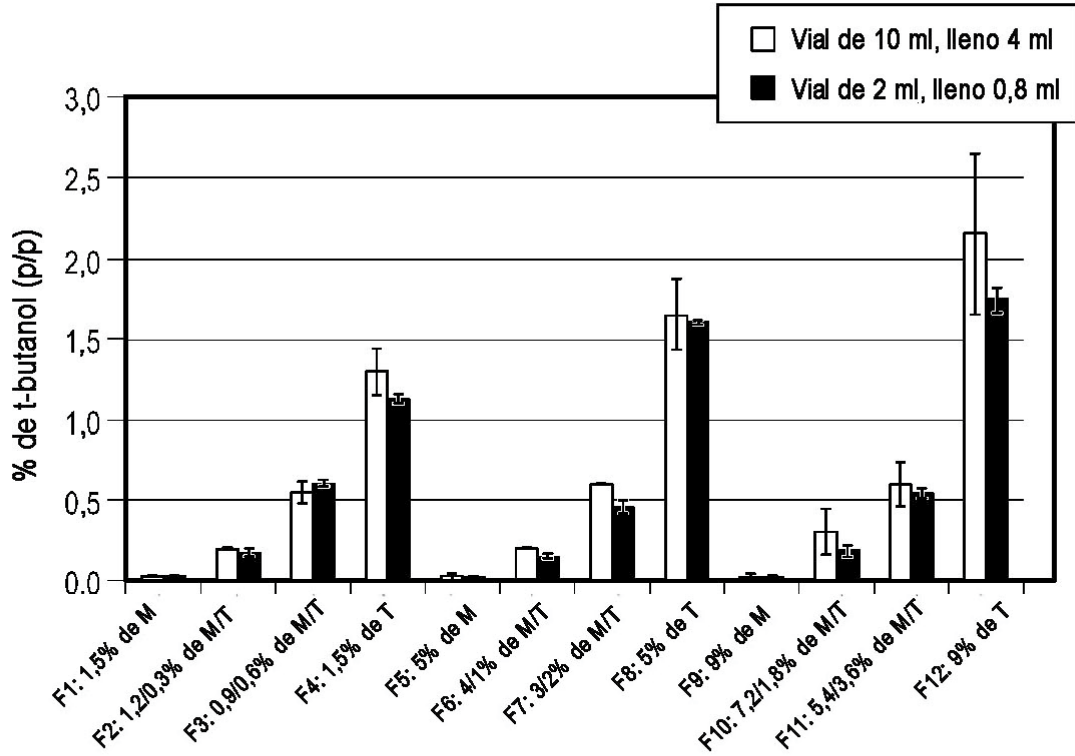


FIG. 19

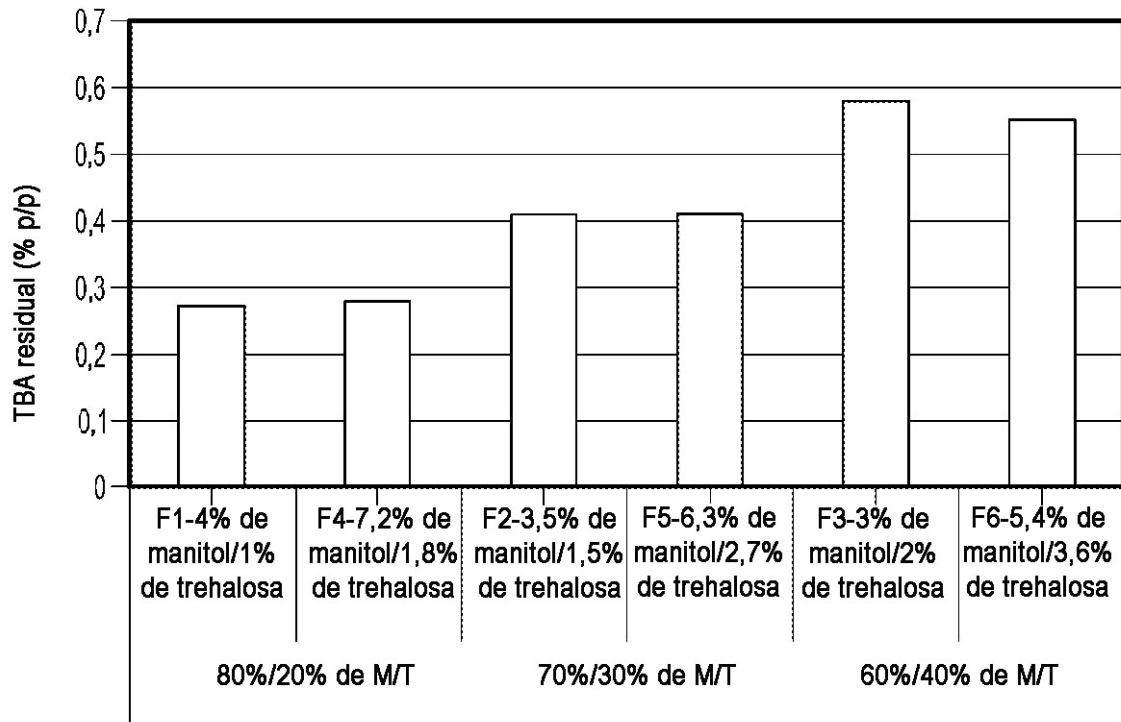


FIG. 20

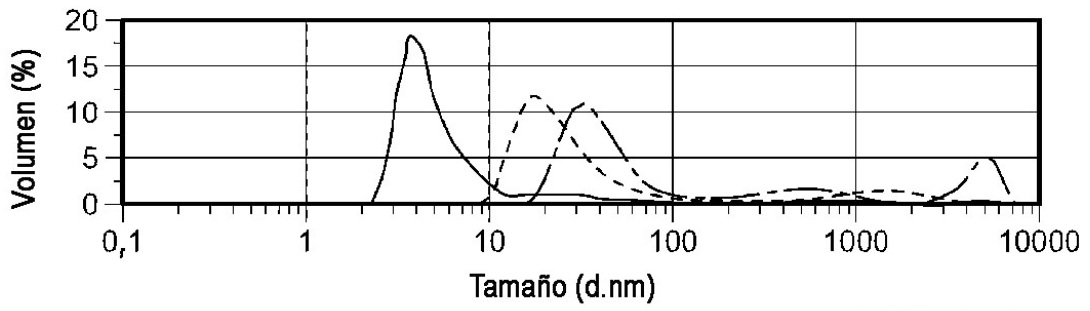


FIG. 21A

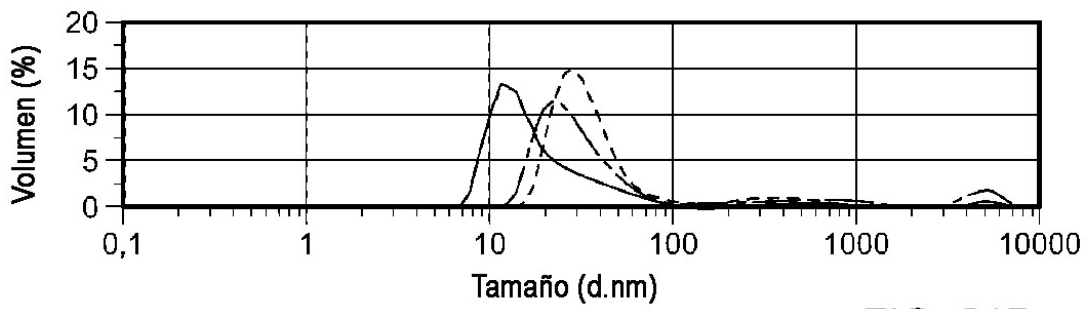


FIG. 21B

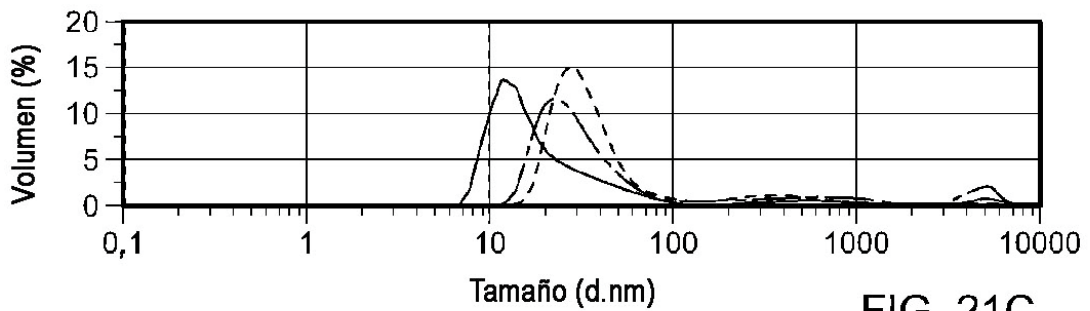


FIG. 21C

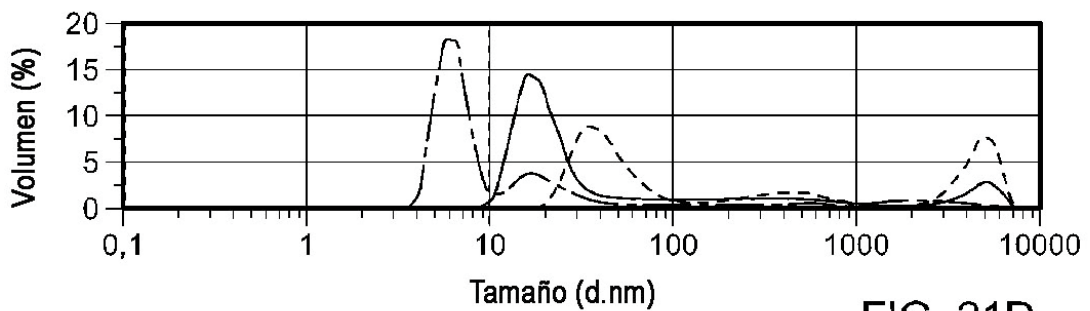


FIG. 21D

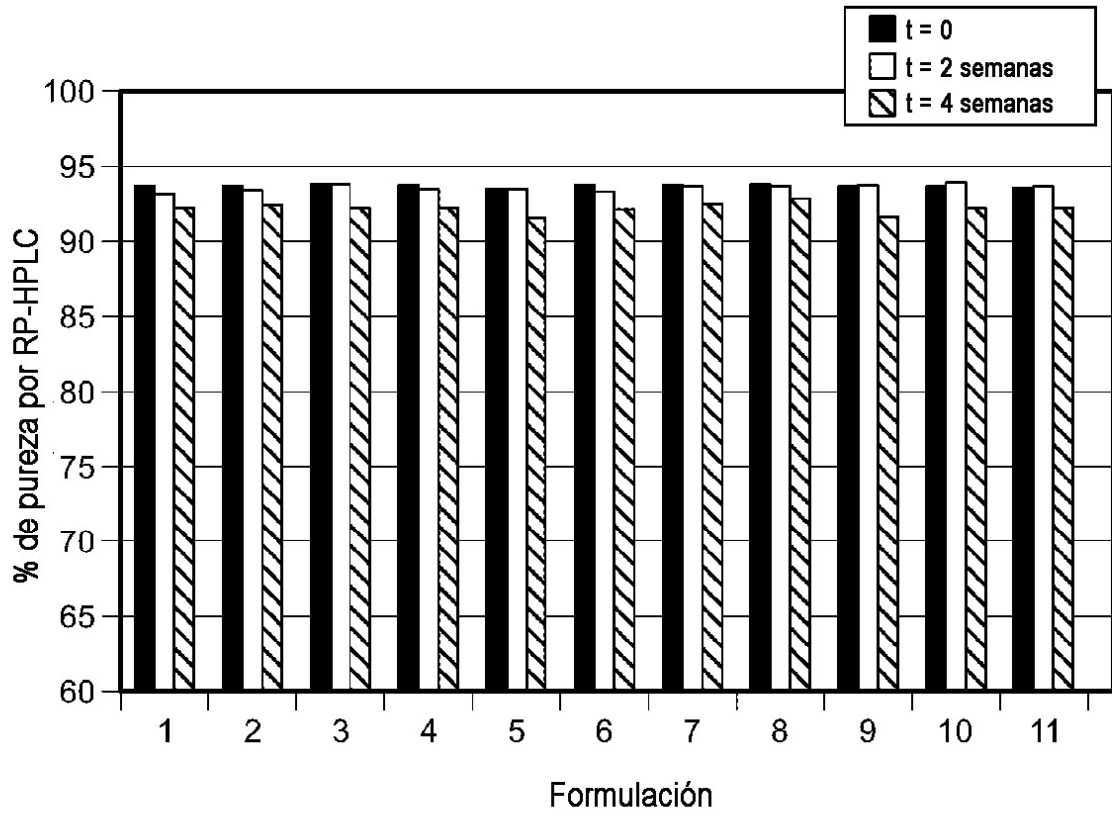


FIG. 22

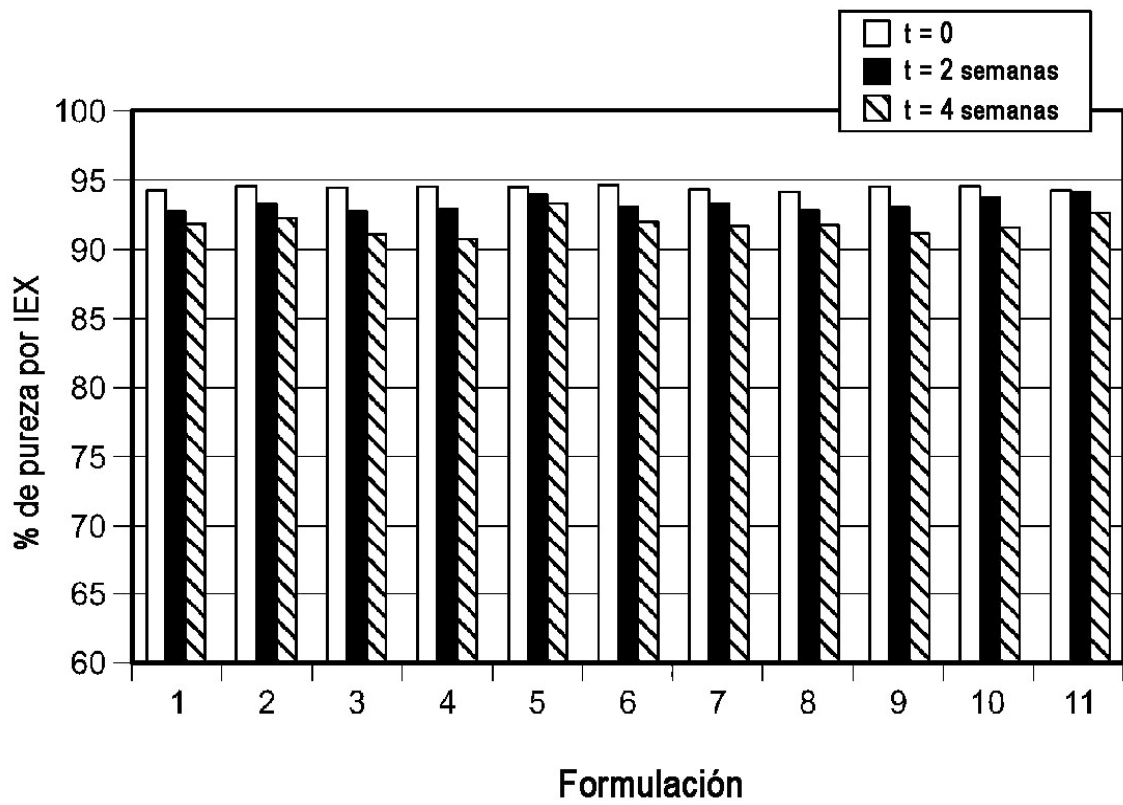


FIG. 23

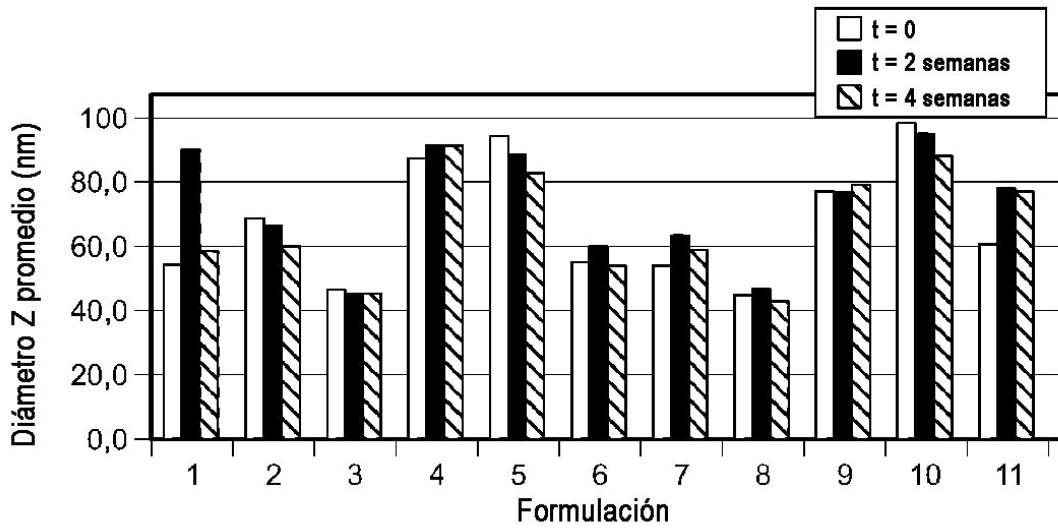


FIG. 24

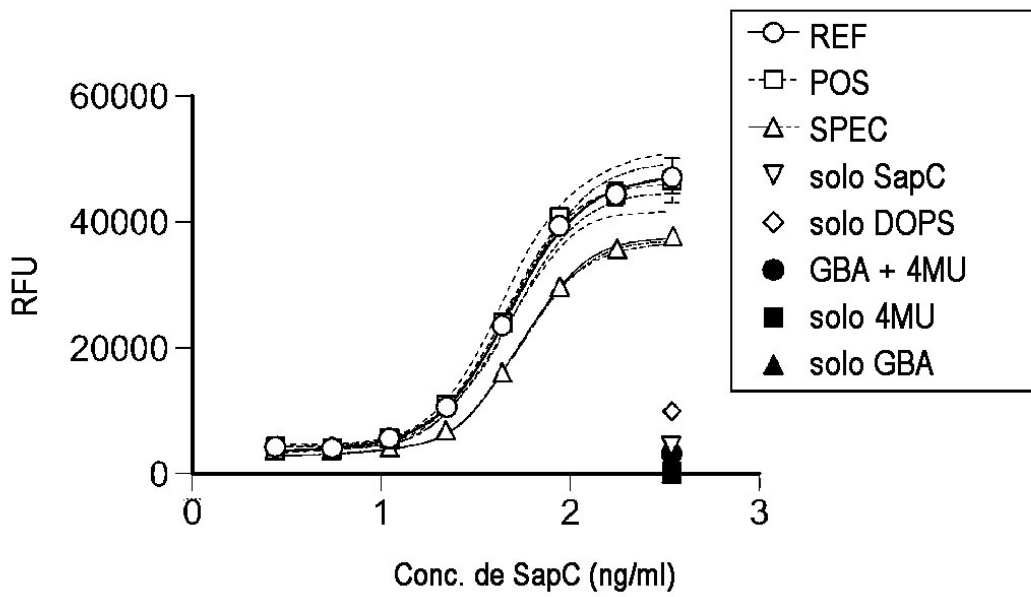


FIG. 25

DOSIS (mg/kg)	0,7	1,1	1,4	1,8	2,4
N	1	3	3	3	8
Media de edad	64	53	58	49	54
F:M	0:1	0:3	2:1	1:2	2:2
Tumor sólido	0	2	1	1	5
RANO mejorado (n/N DY113)	1/1	1/1	1/2	-	-
Respuesta parcial					
HGG	1	1	2	2	3
RECIST mejorado (n/N DY113)	1/1				2/2
Discontinuación no relacionada		3	3	2	7
Eventos adversos (n Casos, n Eventos)	1,15	3,54	3,37	3,32	8,80
Gravedad moderada, relacionada		3,6	1,1	1,2	2,2
Fatiga		2,2		1,2	1,1
Neutropenia		1,1			
ECG		1,2			
Equilibrio		1,1			
Nervioso		1,1			
Disartria		1,1			
Urinario			1,1		
Tensión arterial					1,1
Grave, no relacionada	1,1	1,4	1,3	1,3	3,5
GI		1,1	1,1		1,3
Hiponatremia		1,1			
Debilidad			1,1		

HGG: glioma de grado alto, RECIST: criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos, RANO: evaluación de respuesta en criterios de neuro-oncología

FIG. 26

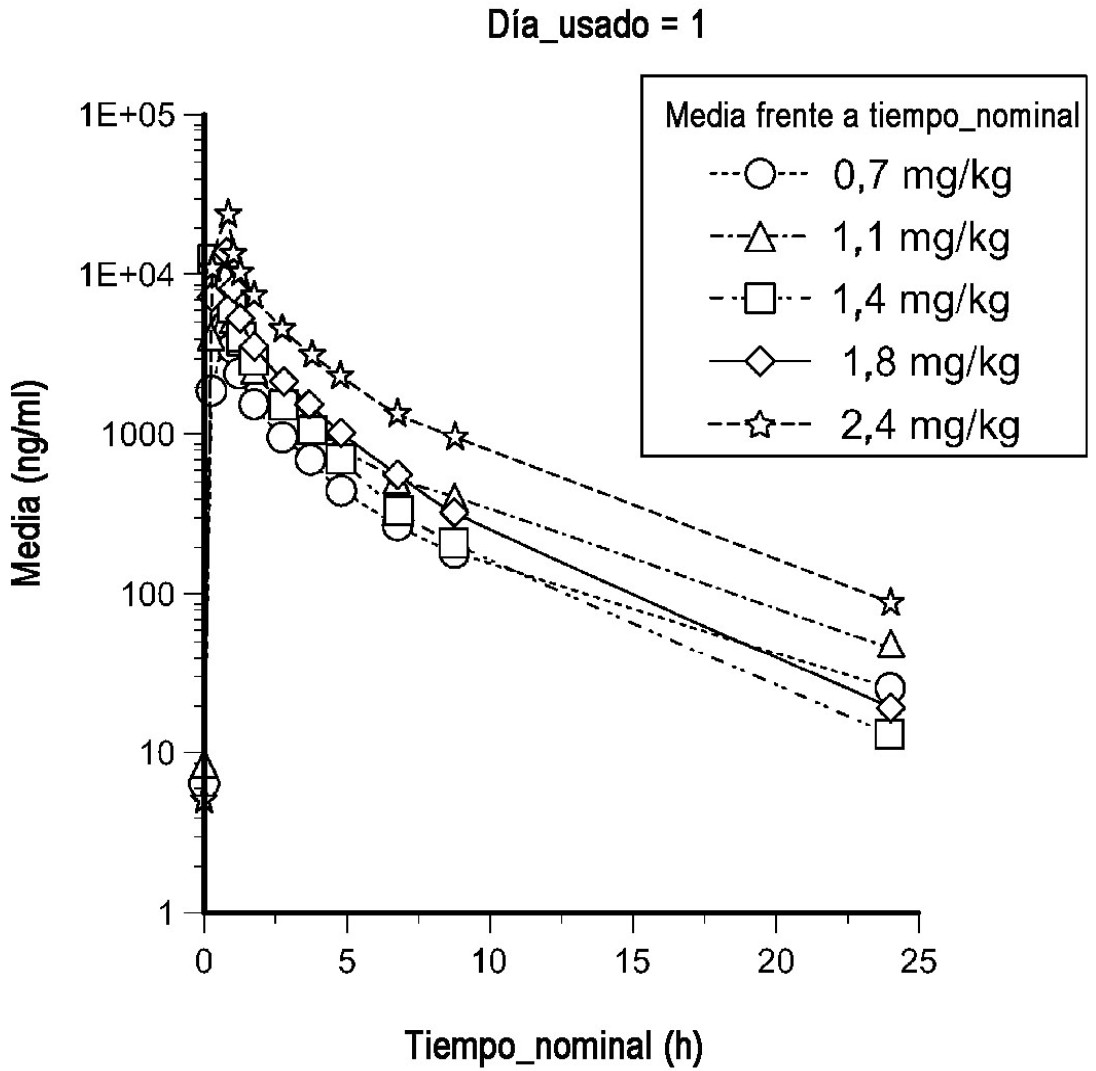


FIG. 27A

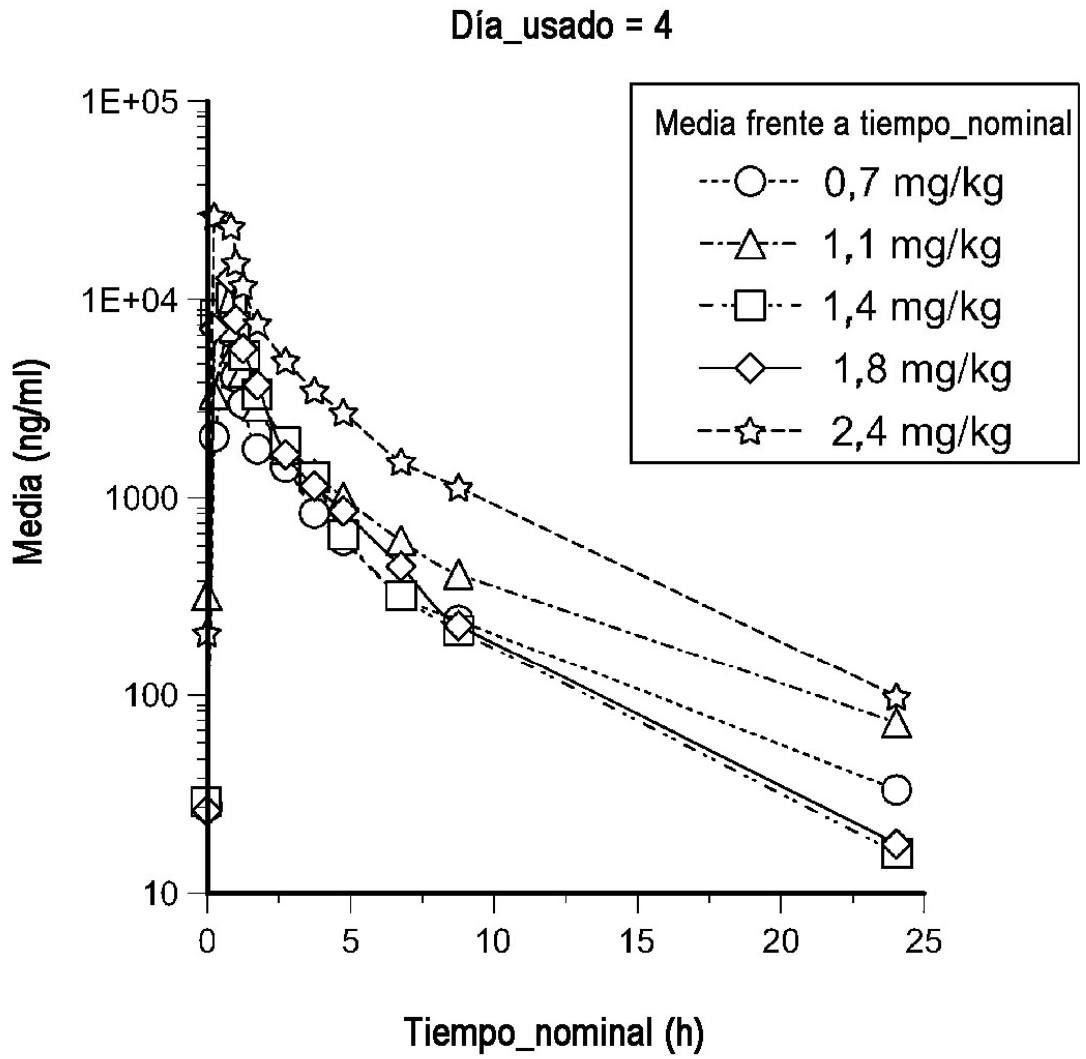


FIG. 27B

Día_usado = 22

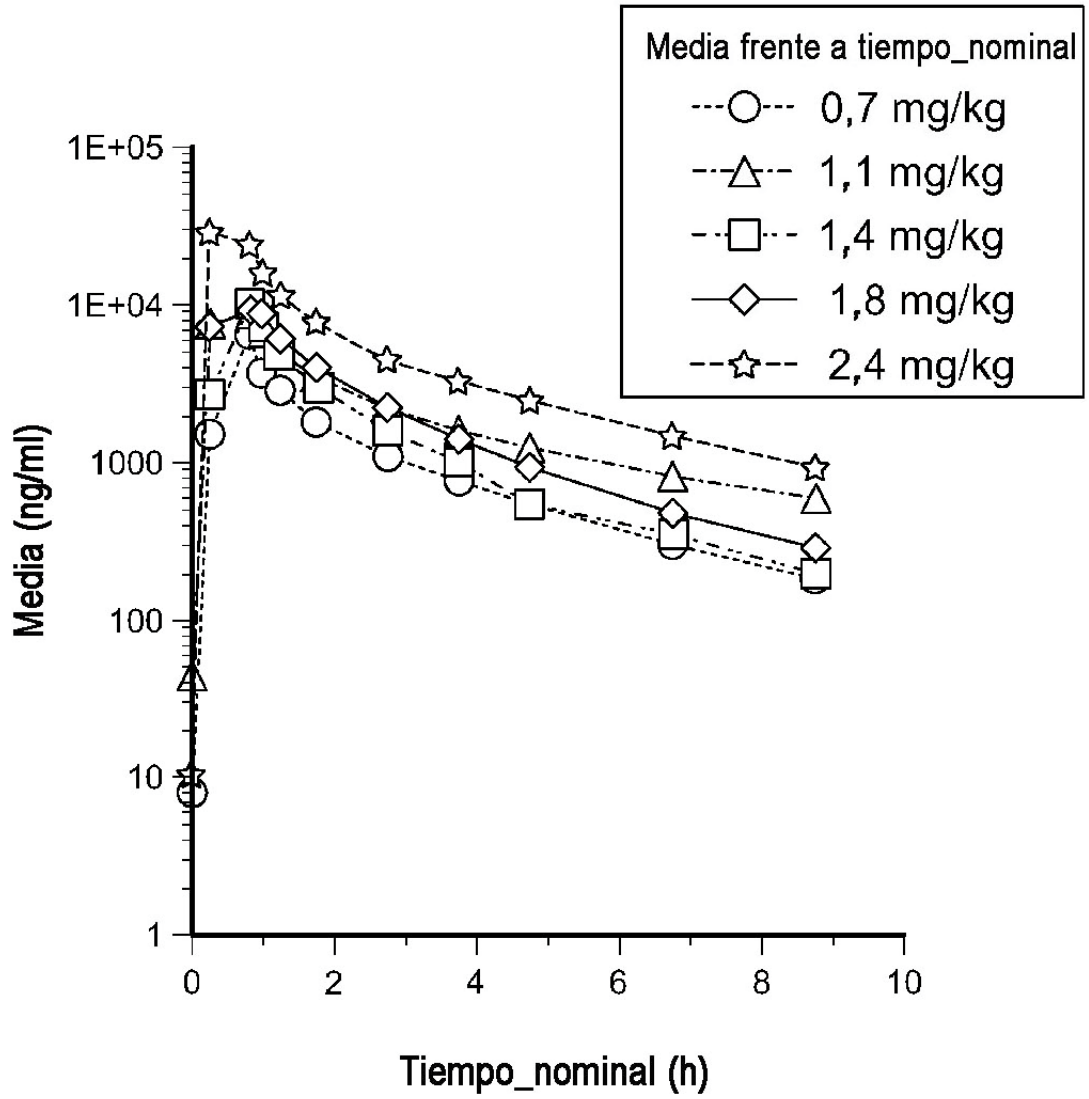


FIG. 27C

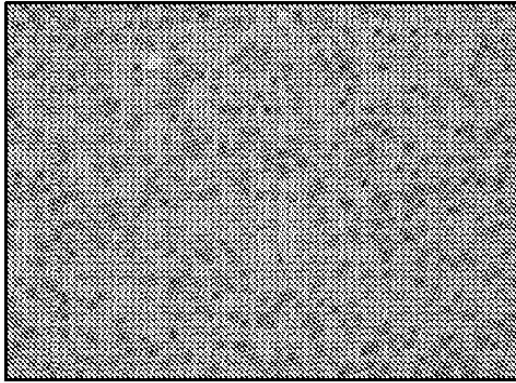


FIG. 28A

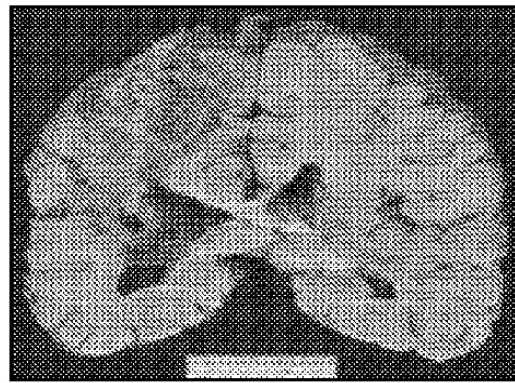


FIG. 28B

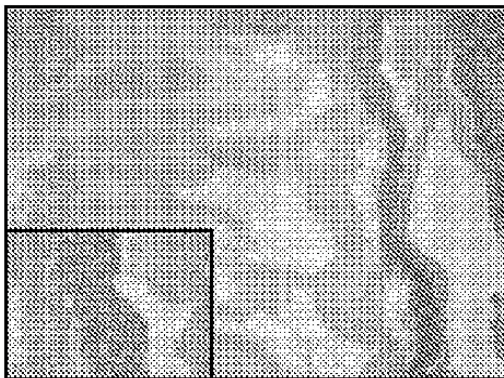


FIG. 28C

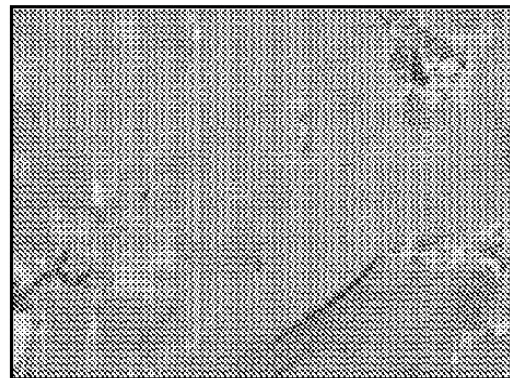
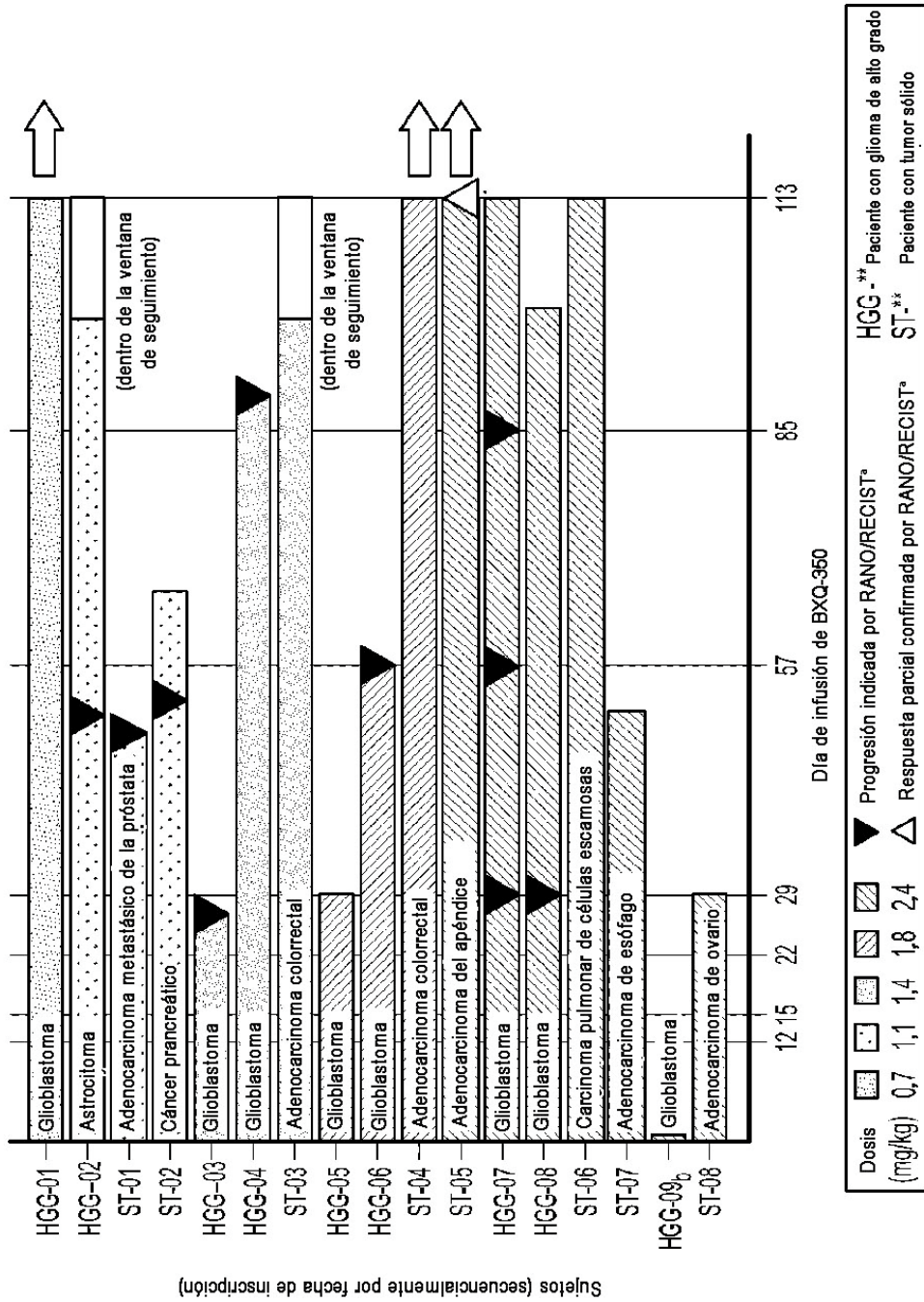


FIG. 28D



^a Enfermedad estable por RANO/RECIST realizada en el estudio se mantuvo a menos que esté marcada con flechas rojas/verdes, otros deterioros clínicos o signos/síntomas de progresión no confirmados por obtención de imágenes de estudio no se muestran

^b El sujeto HGG-09 se retiró por razones no relacionadas con la intervención de estudio tras la primera dosis

FIG. 29

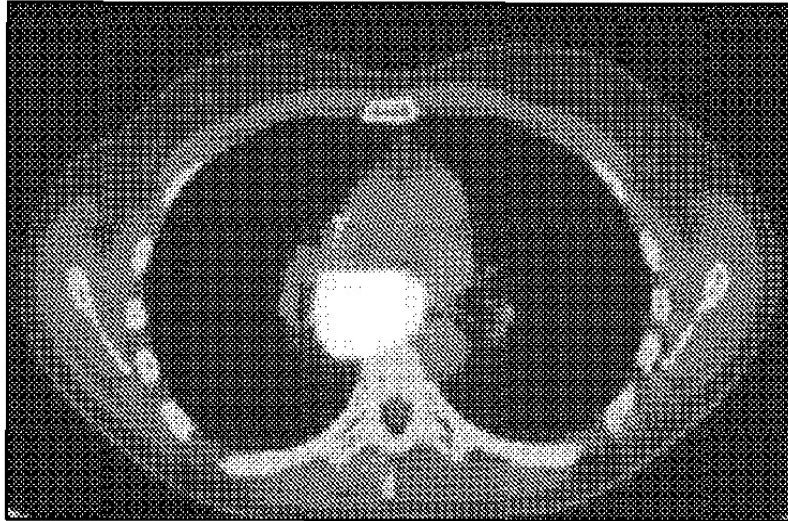


FIG. 30A

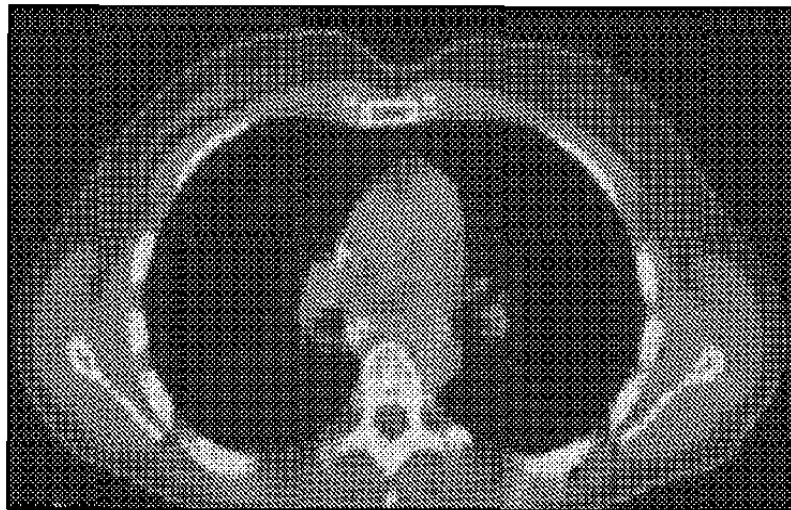


FIG. 30B