

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 927 990**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.05.2015 PCT/IB2015/053602**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2015 WO15173782**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2015 E 15724070 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2022 EP 3143047**

(54) Título: **Formulación de belimumab**

(30) Prioridad:

16.05.2014 US 201461994427 P
18.12.2014 US 201462093734 P
22.12.2014 US 201462095181 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.11.2022

(73) Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY MANAGEMENT LIMITED (50.0%)
980 Great West Road
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB y
GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY LIMITED (50.0%)

(72) Inventor/es:

BLAKE-HASKINS, ANGELA;
MARSHALL, TRISTAN;
O'BERRY, KRISTEN y
PERKINS, MELISSA D.

(74) Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

ES 2 927 990 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulación de belimumab

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas de una proteína de unión a antígeno farmacéuticamente activa, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal. Tales formulaciones comprenden, además de la proteína de unión a antígeno, un agente amortiguador y un agente de tonicidad.

10

10 Antecedentes de la invención

El uso farmacéutico de anticuerpos ha aumentado en los últimos años. En muchos casos, dichos anticuerpos se inyectan por vía intravenosa (IV). Desafortunadamente, la cantidad de anticuerpo que se puede inyectar por vía intravenosa está limitada por las propiedades fisicoquímicas del anticuerpo, en particular por su solubilidad y estabilidad en una formulación líquida adecuada y por el volumen del líquido de infusión. Las vías de administración alternativas son la inyección subcutánea o intramuscular, que ofrecen posibles ventajas en términos de cumplimiento del paciente y facilidad de administración. Estas vías de inyección requieren una alta concentración de proteínas en la solución final que se va a inyectar.

20

En consecuencia, existe un deseo de proporcionar formulaciones farmacéuticas estables y altamente concentradas, de proteínas de unión a antígeno terapéuticamente activas tales como anticuerpos para inyección subcutánea. La ventaja de las inyecciones subcutáneas es que permiten al médico especialista realizarlas en una intervención bastante corta con el paciente. Además, el paciente puede capacitarse para realizar la inyección subcutánea por sí mismo. Dicha administración a sí mismo es particularmente útil durante la dosificación de mantenimiento porque no precisa de atención hospitalaria (utilización reducida de recursos médicos). Por lo general, las inyecciones por vía subcutánea se limitan a aproximadamente 2 ml. Para pacientes que requieren múltiples dosis, se pueden inyectar varias formulaciones de dosis unitarias en múltiples sitios de la superficie corporal.

30

El documento D2 (April ET AL: "product monograph BENLYSTA TM", 16 de abril de 2014 (2014-04-16), XPO55203701) divulga la monografía del producto para Benlysta en polvo liofilizado para suministro intravenoso.

Sumario de la invención

35

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una formulación farmacéutica para una proteína de unión a antígeno que comprende un agente amortiguador y un agente de tonicidad. Más particularmente, la presente divulgación proporciona de aproximadamente 150 a 250 mg/ml de proteína de unión a antígeno; de aproximadamente 1 a 100 mM de un agente amortiguador que proporciona un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0; y de aproximadamente 70 a 170 mM de un agente de tonicidad. En una realización, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo anti-BLyS.

40

En un aspecto, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica para un anticuerpo monoclonal que comprende 200 mg/ml de anticuerpo monoclonal; 10 mM de un agente amortiguador de histidina; 115 mM de NaCl; 25 mM de arginina; y 0,01 % (p/v) de polisorbato 80; a un pH de 6,0; y en donde el anticuerpo monoclonal comprende cadenas pesadas y ligeras que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 6 y 7.

50

La divulgación proporciona una formulación farmacéutica para una proteína de unión a antígeno que comprende un agente amortiguador, un estabilizante, un agente de tonicidad y un tensioactivo no iónico. Más particularmente, la presente divulgación proporciona una formulación farmacéutica que comprende la proteína de unión a antígeno, histidina, arginina, NaCl y polisorbato 80. En una realización, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo anti-BLyS.

55

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad o afección que es susceptible de tratamiento con un anticuerpo anti-BLyS en un sujeto que comprende administrar una formulación según la presente invención en un sujeto en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o afección. En un aspecto, la enfermedad o afección es una enfermedad o trastorno autoinmunitarios.

60

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende uno o más viales que contienen la formulación según la presente invención e instrucciones para la administración subcutánea de la formulación a un paciente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo de inyección que comprende una formulación de anticuerpo anti-BLyS estable descrita en el presente documento.

Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia

- 5 En otro aspecto, la presente invención proporciona una formulación según la presente invención para su uso en el tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico, vasculitis por anticuerpos contra el citoplasma de neutrófilos (ANCA), nefritis lúpica, síndrome de Sjögren primario, trombocitopenia inmunitaria crónica, miastenia grave, macroglobulinemia de Waldenström sintomática, desensibilización inmunitaria de pacientes que esperan un trasplante de riñón, nefropatía membranosa, esclerosis sistémica, artritis reumatoide, 10 mieloma múltiple, esclerosis múltiple e insuficiencia renal.

Breve descripción de los dibujos

- La figura 1 muestra el efecto de la concentración de proteína en la tasa de agregación para la formulación 1.
 15 La figura 2 muestra la turbidez de las formulaciones 1 y 5 después de 5 $\frac{1}{4}$ meses a 2-8 °C.
 La figura 3 muestra la relación entre la viscosidad de belimumab y la concentración.
 La figura 4 muestra el cambio en el % de agregado después de 3 meses de almacenamiento a 2-8 °C para varias 20 formulaciones.
 La figura 5 muestra el cambio en el % de agregado después de 3 meses de almacenamiento a varias temperaturas y formulaciones.
 La figura 6 muestra el efecto de la temperatura en las tasas de agregación después de 5 $\frac{1}{4}$ meses a una temperatura de hasta 25 °C, y muestra que la formulación de arginina (recuadros blancos en el gráfico) amortigua significativamente la agregación en comparación con la formulación 1 (recuadros llenos).
 La figura 7 muestra las tasas de agregación de la formulación 1 (recuadros completos; 06-C) y la formulación 5 25 (recuadros huecos; 06-D) entre 125 y 200 mg/ml y -80 °C a 40 °C después de 5 $\frac{1}{4}$ meses de almacenamiento y con qué consistencia la formulación 5 (líneas discontinuas) muestra una tasa de agregación inferior que la formulación 1 (líneas continuas).
 La figura 8 muestra la reducción de las tasas de degradación de CGE de las formulaciones 1 (06-C) y 5 (06-D) entre 125 y 200 mg/ml y -80 °C a 40 °C después de 5 $\frac{1}{4}$ meses de almacenamiento.
 30 La figura 9 muestra las tasas de acidez de las formulaciones 1 (recuadros completos; 06-C) y 5 (recuadros huecos; 06-D) entre 125 y 200 mg/ml y -80 °C a 40 °C después de 5 $\frac{1}{4}$ meses de almacenamiento.
 La figura 10 muestra los niveles de oxidación de la cadena pesada de belimumab en las formulaciones 1 y 5 entre 125 y 200 mg/ml y -80 °C a 40 °C después de 5 $\frac{1}{4}$ meses de almacenamiento.
 35 La figura 11 muestra el mapa de péptidos de belimumab en la formulación 1 a 200 mg/ml después de 5 $\frac{1}{4}$ meses de almacenamiento.
 La figura 12 muestra el mapa de péptidos de belimumab en la formulación 5 a 200 mg/ml después de 5 $\frac{1}{4}$ meses de almacenamiento.
 La figura 13 muestra el mapa de péptidos de muestras de belimumab con diferentes niveles de arginina.
 40 La figura 14 muestra la selección de pH-amortiguador para HTF.
 La figura 15 muestra la interacción de dos factores - pH x amortiguador - monómero por SEC.
 La figura 16 muestra la interacción de dos factores - pH x amortiguador - cIEF principal.
 La figura 17 muestra la viscosidad del anticuerpo anti-IL13 a varias concentraciones.
 La figura 18 muestra los resultados de viscosidad (mPa s (cP)) frente a concentración (mg/ml) para muestras anti- 45 IL13 T=0 del estudio de agitación.
 La figura 19 muestra que se gelificaron muestras de acetato de 7 días (izquierda). No se observó gel en las muestras de succinato o histidina (centro y derecha). Se observó que el vial de succinato de 10 días estaba en un estado de semigel.
 La figura 20 muestra una comparación de espectros de dicroísmo circular de UV cercano para muestras de estabilidad química de 3 meses.

50 Descripción detallada de la invención

Debe entenderse que la presente divulgación no se limita a métodos, reactivos, compuestos, composiciones, o sistemas biológicos particulares, que pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento es únicamente con el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante. Como se usan en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una/o", "el" y "la" incluyen las referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un polipéptido" incluye una combinación de dos o más células, y similares.

60 "Aproximadamente", como se usa en el presente documento, cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones del $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, incluyendo $\pm 5\%$, $\pm 1\%$ y $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos divulgados.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la invención. Aunque pueden utilizarse en la práctica para las pruebas de la presente invención cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, los materiales y métodos preferidos se describen en el presente documento. En la descripción y la reivindicación de la presente invención, se utilizará la siguiente abreviatura.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una formulación farmacéutica para una proteína de unión a antígeno que comprende un agente amortiguador y un agente de tonicidad. También se divulga una formulación farmacéutica para una proteína de unión a antígeno que comprende un agente amortiguador, un estabilizante, un agente de tonicidad y un tensioactivo no iónico. En una realización, la formulación se liofiliza o se seca por pulverización. En determinadas realizaciones, la formulación se liofiliza o se seca por pulverización y luego se reconstituye posteriormente con un agente de dispersión. En una realización, el agente de dispersión es agua estéril o "agua para inyección" (WFI, por sus siglas en inglés). La proteína de unión al antígeno se puede diluir adicionalmente con solución salina isotónica u otros excipientes para producir una concentración deseable antes de la administración.

En una realización, la formulación es una formulación reconstituida. En otra realización, la formulación es una formulación farmacéutica líquida.

La expresión "formulación farmacéutica" o "formulación" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma que permite que sea eficaz la actividad biológica del principio activo y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación. Dichas formulaciones son estériles.

Una formulación "estéril" es aséptica o está exenta de todos los microorganismos vivos y sus esporas.

En realizaciones ilustrativas de la presente invención, las formulaciones líquidas presentan características deseables, tales como características deseables de viscosidad y tensión superficial.

La expresión "tensión superficial" se refiere a la fuerza de atracción ejercida por las moléculas debajo de la superficie sobre las que se encuentran en la interfaz superficie/aire, resultante de la alta concentración molecular de un líquido en comparación con la baja concentración molecular del gas. Líquidos con bajos valores de tensión superficial, tal como líquidos no polares, fluye más fácilmente que el agua. Normalmente, los valores de las tensiones superficiales se expresan en newtons/metros o dinas/centímetros.

"Tensión superficial dinámica", tal como se hace referencia en el presente documento, es la interfaz superficie/aire y la tensión interfacial dinámica a la interfaz superficie/superficie. Hay una serie de métodos alternativos para medir la tensión superficial dinámica, por ejemplo, tensometría de superficie de burbuja cautiva o tensometría de superficie de burbuja pulsante.

El término "viscosidad" se refiere a la resistencia interna al flujo presentada por un fluido a una temperatura específica; la relación entre la tensión de cizalla y la tasa de cizalla. Un líquido tiene una viscosidad de un poise si una fuerza de 1 dina/centímetro cuadrado hace que dos superficies líquidas paralelas de un centímetro cuadrado de área y separadas por un centímetro cuadrado se muevan una al lado de la otra a una velocidad de 1 cm/segundo. Un poise equivale a cien centipoises.

En el presente documento se divulga, la viscosidad de la formulación que comprende el agente amortiguador y el estabilizante se reduce en al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 15 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 25 %, o al menos aproximadamente un 30 % en comparación con la viscosidad de la formulación en ausencia de agente amortiguador y estabilizante. En el presente documento se divulga, la viscosidad de la formulación que comprende el agente amortiguador y el estabilizante es inferior a aproximadamente 50 mPa s (cP), inferior a aproximadamente 45 mPa s (cP), inferior a aproximadamente 40 mPa s (cP), inferior a aproximadamente 35 mPa s (cP), inferior a aproximadamente 30 mPa s (cP), inferior a aproximadamente 25 mPa s (cP), inferior a aproximadamente 20 mPa s (cP), inferior a aproximadamente 15 mPa s (cP) o inferior a aproximadamente 10 mPa s (cP).

Al referirse a la viscosidad aparente, se entiende que el valor de la viscosidad depende de las condiciones en las que se realizó la medición, tales como temperatura, tasa de cizalla y tensión de cizalla empleados. La viscosidad aparente se define como la relación entre la tensión de cizalla y la tasa de cizalla aplicadas. Hay varios métodos alternativos para medir la viscosidad aparente. Por ejemplo, la viscosidad se puede someter a prueba con un cono y una placa adecuados, placa paralela u otro tipo de viscosímetro o reómetro.

"La gelificación se define como el proceso de formación de una red rígida presumiblemente causada por el inicio de superposiciones topológicas entre mAb o filamentos polimerizados, así como por la reticulación y agrupación de estos filamentos. Esta red rígida se manifiesta como un módulo elástico (G') de solución así como un aumento en su módulo viscoso inherente (G'')".

Se divulga un método para reducir o inhibir la gelificación de una solución que comprende utilizar una formulación de la presente invención. Se divulga un método para reducir o inhibir la gelificación de una solución que comprende una proteína terapéutica, comprendiendo el método administrar histidina y cloruro de sodio a la solución.

5 "Polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Un polipéptido puede ser de origen natural (derivado de tejido), de expresión recombinante o natural a partir de preparaciones celulares procariotas o eucariotas, o producirse químicamente a través de métodos sintéticos. Las expresiones se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son
10 un mimético químico artificial de un aminoácido correspondiente de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural. Miméticos de aminoácidos se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a un aminoácido de origen natural. Los restos no naturales están bien descritos en la bibliografía científica y de patentes; a continuación se describen algunas composiciones no naturales ilustrativas
15 útiles como miméticos de restos de aminoácidos naturales y pautas. Los miméticos de aminoácidos aromáticos se pueden generar reemplazando por, p. ej., D- o L-naftilalanina; D- o L-fenilglicina; D- o L-2-tieneilalanina; D- o L-1, -2,3 o 4-pireneilalanina; D- o L-3-tieneilalanina; D- o L-(2-piridinil)-alanina; D- o L-(3-piridinil)-alanina; D- o L-(2-pirazinil)-alanina; D- o L-(4-isopropil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilalanina; D-(trifluorometil)-fenilalanina; D-p-fluoro-fenilalanina; D- o L-p-bifenilfenilalanina; K- o L-p-metoxi-bifenilfenilalanina; D- o L-2-indol(alquil)alaninas; y, D- o L-alquilalaninas, donde alquilo puede ser metilo, etilo, propilo, hexilo, butilo, pentilo, isopropilo, iso-butilo, sec-isotilo, iso-pentilo sustituido o no sustituido, o aminoácidos no ácidos. Los anillos aromáticos de un aminoácido no natural incluyen, p. ej., tiazolilo, tiofenilo, pirazolilo, bencimidazolilo, naftilo, furanilo, anillos aromáticos de pirrolilo y piridilo.

25 "Péptido", como se usa en el presente documento, incluye péptidos que son variaciones conservativas de los péptidos exemplificados específicamente en el presente documento. "Variación conservativa", como se usa en el presente documento, indica la sustitución de un resto de aminoácido por otro resto biológicamente similar. Los ejemplos de variaciones conservativas incluyen, pero sin limitación, la sustitución de un resto hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina, alanina, cisteína, glicina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina, norleucina o metionina por otro, o la sustitución de un resto polar por otro, como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o
30 glutamina por asparagina, y similares. Los aminoácidos hidrófilos neutros que pueden sustituirse entre sí incluyen asparagina, glutamina, serina y treonina. "Variación conservativa" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido original no sustituido siempre que los anticuerpos producidos contra el polipéptido sustituido también inmunorreaccionen con el polipéptido no sustituido. Dichas sustituciones conservativas están dentro de la definición de las clases de péptidos divulgadas. La actividad biológica de los péptidos puede determinarse mediante
35 métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia y descritos en el presente documento.

40 "Recombinante", cuando se usa con referencia a una proteína, indica que la proteína se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o una proteína heterólogos o la alteración de un ácido nucleico o una proteína naturales.

45 Como se usa en el presente documento, una "proteína terapéutica" se refiere a cualquier proteína y/o polipéptido que se puede administrar a un mamífero para provocar una respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que se busca, por ejemplo, por un investigador o médico. Una proteína terapéutica puede provocar más de una respuesta biológica o médica. Asimismo, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa cualquier cantidad que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido dicha cantidad, da como resultado, pero sin limitación, curación, prevención o mejora de una enfermedad, trastorno o efecto secundario o una disminución en la velocidad de avance de una enfermedad o trastorno. La expresión también incluye dentro de su alcance cantidades eficaces para potenciar la función fisiológica normal así como cantidades eficaces para provocar una función fisiológica en un paciente que potencia o ayuda al efecto terapéutico de un segundo agente farmacéutico.

50 Todos los restos de "aminoácidos" identificados en el presente documento están en la configuración L natural. Según la nomenclatura de polipéptidos convencional, las abreviaturas para los restos de aminoácidos se muestran en la siguiente tabla.

55

Tabla 1. Abreviaturas de aminoácidos.

1 letras	3 letras	Aminoácido
Y	Tyr	L-tirosina
G	Gly	L-glicina
F	Phe	L-fenilalanina
M	Met	L-metionina
A	Ala	L-alanina
S	Ser	L-serina
I	Ile	L-isoleucina
L	Leu	leucina

T	Thr	L-treonina
V	Val	L-valina
P	Pro	L-prolina
K	Lys	L-lisina
H	His	L-histidina
Q	Gln	L-glutamina
E	Glu	L-acido glutámico
W	Trp	L-triptófano
R	Arg	L-arginina
D	Asp	L-acido aspártico
N	Asn	L-asparagina
C	Cys	L-cisteína.

Cabe señalar que todas las secuencias de restos de aminoácidos están representadas en el presente documento por fórmulas cuya orientación de izquierda a derecha está en la dirección convencional del extremo amino al extremo carboxilo.

- 5 El polipéptido divulgado en el presente documento es una proteína de unión a antígeno. La proteína de unión a antígeno divulgada en el presente documento se selecciona del grupo que consiste en un receptor soluble, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio variable de inmunoglobulina único, Fab, F(ab')2, Fv, Fv unido a disulfuro, scFv, anticuerpo multiespecífico de conformación cerrada, scFv unido a disulfuro o diacuerpo.
- 10 10 La expresión "proteína de unión a antígeno" como se usa en el presente documento se refiere a anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y otras construcciones de proteínas que son capaces de unirse a un antígeno.
- 15 15 Los términos Fv, Fc, Fd, Fab, o F(ab')2 se usan con sus significados convencionales (véase, p. ej., Harlow *et al.*, Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)).
- 20 20 Un "anticuerpo químérico" se refiere a un tipo de anticuerpo modificado por ingeniería que contiene una región variable natural (cadena ligera y cadenas pesadas) procedente de un anticuerpo donante en asociación con regiones constantes de cadena ligera y pesada procedente de un anticuerpo aceptor.
- 25 25 Un "anticuerpo humanizado" se refiere a un tipo de anticuerpo modificado por ingeniería que tiene sus CDR procedentes de una inmunoglobulina no humana donante, siendo las restantes partes procedentes de la inmunoglobulina de la molécula procedentes de una o más inmunoglobulinas humanas. Además, los restos de soporte del marco pueden alterarse para conservar la afinidad de unión (véanse, p. ej., Queen *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson *et al.*, Bio/Technology, 9:421 (1991)). Un anticuerpo aceptor humano adecuado puede ser uno seleccionado de una base de datos convencional, p. ej., la base de datos KABAT™, base de datos Los Alamos y base de datos Swiss Protein, por homología con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del anticuerpo donante. Un anticuerpo humano caracterizado por una homología con las regiones marco del anticuerpo donante (basándose en los aminoácidos) puede ser adecuado para proporcionar una región constante de cadena pesada y/o una región marco variable de cadena pesada para la inserción de las CDR donantes. Un anticuerpo aceptor adecuado capaz de donar regiones marco variables o constantes de cadena ligera puede seleccionarse de manera similar. Cabe señalar que no es necesario que las cadenas pesada y ligera del anticuerpo aceptor se originen a partir del mismo anticuerpo aceptor. El estado de la técnica describe varias formas de producir dichos anticuerpos humanizados; véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-0239400 y EP-A-054951.
- 30 30 35 La expresión "anticuerpo donante" se refiere a un anticuerpo (monoclonal y/o recombinante) que aporta las secuencias de aminoácidos de sus regiones variables, CDR u otros fragmentos funcionales o análogos de los mismos a un primer compañero de inmunoglobulina, para proporcionar a la región codificante de inmunoglobulina alterada y al anticuerpo alterado expresado resultante la especificidad antigenica y la actividad neutralizante características del anticuerpo donante.
- 40 40 45 La expresión "anticuerpo aceptor" se refiere a un anticuerpo (monoclonal y/o recombinante) heterólogo al anticuerpo donante, que aporta todas (o cualquier porción, pero en algunas realizaciones la totalidad) las secuencias de aminoácidos que codifican sus regiones marco de cadena pesada y/o ligera y/o sus regiones constantes de cadena pesada y/o ligera al primer compañero de inmunoglobulina asociado. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humano es el anticuerpo aceptor.
- 45 50 Las "CDR" se definen como secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad de un anticuerpo que son las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina. Véase, p. ej., Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4^a Ed., U.S. Department of Health and Human Services,

- National Institutes of Health (1987). Hay tres CDR (o regiones CDR) de cadena pesada y tres de cadena ligera en la porción variable de una inmunoglobulina. Por lo tanto, "CDR", como se usa en el presente documento, se refiere a las tres CDR de cadena pesada, o las tres CDR de cadena ligera (o todas las CDR de cadena pesada y todas las de cadena ligera, si corresponde). La estructura y el plegamiento de la proteína del anticuerpo puede hacer que otros 5 restos se consideren parte de la región de unión al antígeno y así lo debe entender un experto en la materia. Véase, por ejemplo, Chothia *et al.*, (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions; Nature 342, págs. 877-883.
- Como se usa en el presente documento, el término "dominio" se refiere a una estructura de proteína plegada que tiene 10 una estructura terciaria independiente del resto de la proteína. En general, los dominios son responsables de las propiedades funcionales individuales de las proteínas y, en muchos casos, pueden añadirse, retirarse o transferirse a otras proteínas sin pérdida de función del resto de la proteína y/o del dominio. Un "dominio variable único de anticuerpo" es un dominio de polipéptido plegado que comprende secuencias características de dominios variables de anticuerpo. Por tanto, incluye dominios variables de anticuerpo completos y dominios variables modificados, por 15 ejemplo, en los que uno o más bucles se han reemplazado por secuencias que no son características de los dominios variables de anticuerpo, o dominios variables de anticuerpo que se han truncado o comprenden extensiones amino o carboxiterminales, así como fragmentos plegados de dominios variables que conservan al menos la actividad de unión y la especificidad del dominio de longitud completa.
- La expresión "dominio variable de inmunoglobulina único" se refiere a un dominio variable de anticuerpo (V_H , V_{HH} , V_L) que se une específicamente a un antígeno o epítopo independientemente de una región o dominio V diferente. Un 20 dominio variable de inmunoglobulina único puede estar presente en un formato (p. ej., homo o heteromultímero) con otras regiones variables o dominios variables diferentes donde las otras regiones o dominios no son necesarios para la unión al antígeno por el dominio variable de inmunoglobulina único (es decir, donde el dominio variable de inmunoglobulina único se une al antígeno independientemente de los dominios variables adicionales). Un "anticuerpo de dominio" o "dAb" es lo mismo que un "dominio variable de inmunoglobulina único" que es capaz de unirse a un 25 antígeno como se usa el término en el presente documento. Un dominio variable de inmunoglobulina único puede ser un dominio variable de anticuerpo humano, pero también incluye dominios variables de anticuerpo únicos de otras especies tales como roedores (por ejemplo, como se divulga en el documento WO 00/29004), dAb V_{HH} de tiburón nodriza y camélidos. Los V_{HH} de camélidos son polipéptidos de dominio variable de inmunoglobulina único que 30 proceden de especies que incluyen camello, llama, alpaca, dromedario y guanaco, que producen anticuerpos de cadena pesada desprovistos de forma natural de cadenas ligeras. Dichos dominios V_{HH} pueden humanizarse según técnicas convencionales disponibles en la técnica y dichos dominios se consideran "anticuerpos de dominio" según la divulgación. Como se usa en el presente documento, " V_H " incluye dominios V_{HH} de camélidos. Los NARV son otro tipo 35 de dominio variable de inmunoglobulina único que se identificaron en peces cartilaginosos, incluido el tiburón nodriza. Estos dominios también se conocen como región variable de receptor de antígeno nuevo (comúnmente abreviada como $V(NAR)$ o NARV). Para detalles adicionales, véase Mol. Immunol. 44, 656-665 (2006) y el documento US20050043519A.
- La expresión "dominio de unión a epítopo" se refiere a un dominio que se une específicamente a un antígeno o epítopo 40 independientemente de una región o dominio V diferente, esto puede ser un anticuerpo de dominio (dAb), por ejemplo, un dominio variable de inmunoglobulina único humano, de camélido o tiburón.
- Como se utiliza en el presente documento, la expresión "sitio de unión a antígeno" se refiere a un sitio en una proteína 45 que es capaz de unirse específicamente al antígeno, este puede ser un dominio único, por ejemplo, un dominio de unión a epítopo, o puede ser dominios V_H/V_L emparejados que se pueden encontrar en un anticuerpo convencional. Los dominios Fv de cadena sencilla (ScFv) divulgados en el presente documento, pueden proporcionar sitios de unión a antígeno.
- Los términos "mAbdAb" y "dAbmAb" se utilizan en el presente documento para referirse a las proteínas de unión a 50 antígeno divulgadas en el presente documento. Los dos términos se pueden usar indistintamente y se pretende que tengan el mismo significado que se usa en el presente documento.
- La formulación farmacéutica divulgada proporciona aproximadamente de 150 a 250 mg/ml de proteína de unión a antígeno; de aproximadamente 1 a 100 mM de un agente amortiguador que proporciona un pH de aproximadamente 55 5,0 a aproximadamente 7,0; y de aproximadamente 70 a 170 mM de un agente de tonicidad. Como alternativa, la formulación farmacéutica divulgada proporciona aproximadamente de 150 a 250 mg/ml de proteína de unión a antígeno; aproximadamente de 1 a 100 mM de un agente amortiguador que proporciona un pH de $6,0 \pm 0,5$; aproximadamente de 1 a 100 mM de un estabilizante; aproximadamente de 90 a 150 mM de un agente de tonicidad; 60 y aproximadamente del 0,005 al 0,015 % (p/v) de un tensioactivo no iónico. En una realización, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo anti-proteína estimuladora de linfocitos B (anti-BLyS).

También se describe una formulación farmacéutica que comprende aproximadamente de 150 a 250 mg/ml de proteína de unión a antígeno; aproximadamente de 1 a 100 mM de histidina a un pH de $6,0 \pm 0,5$; NaCl de aproximadamente

70 a 170 mM. La formulación divulgada en el presente documento comprende además aproximadamente de 0,005 a 0,03 % (p/v) de un tensioactivo no iónico. La formulación divulgada en el presente documento comprende además de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 mM de un quelante de metales.

- 5 En un aspecto, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica para un anticuerpo monoclonal que comprende aproximadamente 200 mg/ml de anticuerpo monoclonal; aproximadamente 10 mM de un agente amortiguador de histidina; aproximadamente 115 mM de NaCl; aproximadamente 25 mM de arginina; y aproximadamente 0,01 % (p/v) de polisorbato 80, a aproximadamente un pH de 6,0; y en donde el anticuerpo monoclonal comprende cadenas pesadas y ligeras que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 6 y 7.

10 La formulación farmacéutica de la presente invención se puede proporcionar en forma líquida o se puede proporcionar en forma liofilizada.

- 15 La formulación farmacéutica según la presente invención comprende un agente amortiguador. Los agentes amortiguadores incluyen, pero sin limitación, ácido cítrico, HEPES, histidina, acetato de potasio, citrato de potasio, fosfato de potasio (KH_2PO_4), acetato sódico, bicarbonato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio (NAH_2PO_4), base Tris y Tris-HCl. En una realización, el agente amortiguador es histidina. La concentración de histidina divulgada es de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 mM. La concentración de histidina divulgada en el presente documento es de aproximadamente 10 ± 5 mM. La concentración de histidina divulgada en el presente documento es de aproximadamente 10 ± 2 mM. En una realización, la concentración de histidina es de aproximadamente 10 mM. La concentración de histidina divulgada en el presente documento es de aproximadamente 15 mM

- 20 25 Como se usa en el presente documento, la expresión "agente amortiguador que proporciona un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0" se refiere a un agente que proporciona que la solución que lo comprende resista los cambios de pH por la acción de sus componentes conjugados ácido/base. El amortiguador utilizado en las formulaciones según la divulgación puede tener un pH en el intervalo de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, o de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,2. En una realización el pH es de aproximadamente 6,0. El pH divulgado en el presente documento es de aproximadamente 6,250. Los ejemplos de agentes amortiguadores que controlarán el pH en este intervalo incluyen acetato, succinato, gluconato, histidina, citrato, glicilglicina y otros amortiguadores ácidos orgánicos. El amortiguador más adecuado según la presente invención es un amortiguador de histidina, como por ej. L-histidina.

- 30 35 Un "amortiguador de histidina" es un amortiguador que comprende el aminoácido histidina. Los ejemplos de amortiguadores de histidina incluyen cloruro de histidina, acetato de histidina, fosfato de histidina, sulfato de histidina. La formulación de histidina identificada en los ejemplos como la más adecuada es un amortiguador de histidina elaborado a partir de 0,65 mg/ml de L-histidina, 1,2 mg/ml de monoclórhidrato de L-histidina.

- 40 45 La formulación farmacéutica según la presente invención comprende un agente de tonicidad. Los agentes de tonicidad incluyen, pero sin limitación, dextrosa, glicerina, manitol, cloruro de potasio y cloruro de sodio. En otra realización el agente de tonicidad es cloruro de sodio. En el presente documento se divulga, la concentración de cloruro de sodio es de aproximadamente 70 a 170 mM; de aproximadamente 90-150 mM; o de aproximadamente 115 ± 10 mM. La concentración cloruro de sodio divulgada en el presente documento es de aproximadamente 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170 o 175 mM. En una realización, la concentración de cloruro de sodio es de aproximadamente 115 mM. La concentración de cloruro de sodio divulgada en el presente documento es de aproximadamente 150 ± 10 mM. En el presente documento se divulga, la concentración de cloruro de sodio es de aproximadamente 150 mM.

- 50 Por "isotónico" se entiende que la formulación tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas generalmente tendrán una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm. La isotonicidad se puede medir usando un osmómetro de tipo presión de vapor o de congelación en hielo.

- 55 En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica según la presente invención comprende un estabilizante. Los estabilizantes incluyen, pero sin limitación, seroalbúmina humana (hsa), seroalbúmina bovina (BSA), α -caseína, globulinas, α -lactoalbúmina, LDH, lisozima, mioglobina, ovoalbúmina y RNasa A. Los estabilizantes también incluyen aminoácidos y sus metabolitos, tales como, glicina, alanina (α -alanina, β -alanina), arginina, betaina, leucina, lisina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, 4-hidroxiprolina, sarcosina, ácido γ -aminobutírico (GABA), opinas (alanopina, octopina, estrombina) y N-óxido de trimetilamina (TMAO). En una realización, el estabilizante es un aminoácido. En una realización, el aminoácido es arginina. La concentración de arginina divulgada en el presente documento es de aproximadamente 20 a 30 mM. La concentración de arginina divulgada en el presente documento es de aproximadamente 25 ± 2 mM.

60 En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica según la presente invención comprende un tensioactivo

- no iónico. Los tensioactivos no iónicos incluyen, pero sin limitación, ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán (tales como polisorbato 20 y polisorbato 80), copolímeros de polietileno y polipropileno, polietilen polipropilenglicol, estearatos de polioxietileno, polí(alquiléteres de oxietileno), p. ej. poli (monolauriléter de polioxietileno, éteres de alquilfenilpolioxietileno (Triton-X), copolímero de polioxietileno-polioxipropileno (Poloxamer, Pluronic), dodecilsulfato de sodio (SDS). En una realización, el tensioactivo no iónico es polisorbato 80. La concentración de polisorbato 80 divulgada en el presente documento es de aproximadamente 0,005 a 0,02 % (p/v). En una realización, la concentración de polisorbato 80 es de aproximadamente 0,01 % (p/v). La concentración de polisorbato 80 divulgada en el presente documento es de aproximadamente 0,02 % (p/v).
- 10 La formulación farmacéutica divulgada en el presente documento comprende un quelante de metales. Los quelantes de metales incluyen, pero sin limitación EDTA y EGTA. El quelante de metales descrito en el presente documento es EDTA. La concentración de EDTA divulgada en el presente documento es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,02 mM. La concentración de EDTA divulgada en el presente documento es de aproximadamente 0,05 mM.
- 15 20 En una realización, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo. En una realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo es de ratón, químérico, humanizado o completamente humano. El anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo divulgados en el presente documento se une a BLYs o IL-13.
- 25 La formulación divulgada comprende la proteína de unión a antígeno, histidina, arginina, NaCl y polisorbato 80. En un aspecto, la formulación comprende aproximadamente 200 mg/ml de proteína de unión a antígeno, aproximadamente histidina 10 mM, aproximadamente arginina 25 mM, aproximadamente NaCl 115 mM y aproximadamente polisorbato 80 al 0,01 %, a aproximadamente pH 6,0. En una realización, la proteína de unión al antígeno se une a BLYs.
- 30 35 40 45 En un aspecto, la formulación farmacéutica de la presente invención es estable tras la congelación y descongelación. Una formulación "estable" es aquella en la que todas las proteínas en la misma conservan esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica durante el almacenamiento a la temperatura de almacenamiento prevista, p. ej. 2-8 °C. Se desea que la formulación conserve esencialmente su estabilidad física y química, así como su actividad biológica durante el almacenamiento. El período de almacenamiento generalmente se selecciona en función de la vida útil prevista de la formulación. Asimismo, la formulación debe ser estable después de la congelación (a, p. ej., -70 °C.) y descongelación de la formulación, por ejemplo después de 1, 2 o 3 ciclos de congelación y descongelación. Diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de las proteínas están disponibles en la técnica y se revisan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993), por ejemplo. La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado. La estabilidad se puede evaluar cualitativa y/o cuantitativamente en una variedad de formas diferentes, incluida la evaluación de la formación de agregados (por ejemplo, utilizando cromatografía de exclusión por tamaño, midiendo la turbidez y/o mediante inspección visual); evaluando la heterogeneidad de la carga usando cromatografía de intercambio catiónico o electroforesis de zona capilar; análisis de secuencia aminoterminal o carboxiterminal; análisis por espectrometría de masas; análisis SDS-PAGE para comparar anticuerpos reducidos e intactos; análisis de mapas peptídicos (por ejemplo, tríptico o LYS-C); evaluación de la actividad biológica o la función de unión a antígeno del anticuerpo; etc.
- 50 En una realización, la formulación farmacéutica de la presente invención es adecuada para administración subcutánea o intramuscular.
- 55 El "porcentaje de identidad" entre una secuencia de aminoácidos de consulta y una secuencia de aminoácidos objeto es el valor de "identidades", expresadas como un porcentaje, que se calcula mediante el algoritmo BLASTP cuando una secuencia de aminoácidos objeto tiene una cobertura de consulta del 100 % con una secuencia de aminoácidos de consulta después de realizar una alineación BLASTP por pares. Dichas alineaciones BLASTP por pares entre una secuencia de aminoácidos de consulta y una secuencia de aminoácido objeto se realizan utilizando la configuración predeterminada del algoritmo BLASTP disponible en el sitio web del National Center for Biotechnology Institute con el filtro para regiones de baja complejidad desactivado. Es importante destacar que, una secuencia de aminoácidos de consulta puede describirse mediante una secuencia de aminoácidos identificada en una o más reivindicaciones en el presente documento.
- 60 La secuencia de consulta puede ser 100 % idéntica a la secuencia objeto, o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de aminoácidos en comparación con la secuencia objeto, de modo que el % de identidad sea inferior al 100 %. Por ejemplo, la secuencia de consulta es al menos un 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la secuencia objeto. Dichas alteraciones incluyen al menos una eliminación, sustitución incluyendo sustitución conservativa y no conservativa), o inserción, de un aminoácido y en donde dichas alteraciones pueden

darse en las posiciones amino o carboxiterminal de la secuencia de consulta o en cualquier parte entre estas posiciones terminales, intercaladas ya sea individualmente entre los aminoácidos en la secuencia de consulta o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de consulta.

- 5 El % de identidad puede determinarse a lo largo de longitud de la secuencia de consulta, incluyendo una o más CDR. Como alternativa, el % de identidad puede excluir una o más CDR, por ejemplo, las CDR son 100 % idénticas a la secuencia objeto y el % de variación de identidad está en la parte restante de la secuencia de consulta, para que la secuencia de CDR sea fija/intacta.
- 10 En una realización, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo. En una realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo es de ratón, químérico, humanizado o completamente humano. En una realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo se une a BLyS (SEQ ID NO: 1) o una forma hetero u homotrimérica de BLyS, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo se une a la forma soluble de BLyS (SEQ ID NO: 10). El anticuerpo monoclonal divulgado en el presente documento comprende regiones variables de cadena ligera y pesada que comprenden secuencias de aminoácidos que son un 90 % idénticas a, o un 91 % idénticas a, o un 92 % idénticas a, o un 93 % idénticas a, o un 94 % idénticas a, o un 95 % idénticas a, o un 96 % idénticas a, o un 97 % idénticas a, o un 98 % idénticas a, o un 99 % idénticas a la SEQ ID NO: 2 y un 90 % idénticas a, o un 91 % idénticas a, o un 92 % idénticas a, o un 93 % idénticas a, o un 94 % idénticas a, o un 95 % idénticas a, o un 96 % idénticas a, o un 97 % idénticas a, o un 98 % idénticas a, o un 99 % idénticas a la SEQ ID NO: 3, respectivamente, o secuencias de aminoácidos que son un 90 % idénticas a, o un 91 % idénticas a, o un 92 % idénticas a, o un 93 % idénticas a, o un 94 % idénticas a, o un 95 % idénticas a, o un 96 % idénticas a, o un 97 % idénticas a, o un 98 % idénticas a, o un 99 % idénticas a la SEQ ID NO: 4 y un 90 % idénticas a, o un 91 % idénticas a, o un 92 % idénticas a, o un 93 % idénticas a, o un 94 % idénticas a, o un 95 % idénticas a, o un 96 % idénticas a, o un 97 % idénticas a, o un 98 % idénticas a, o un 99 % idénticas a la SEQ ID NO: 5, respectivamente. En una realización, el anticuerpo monoclonal comprende regiones variables de cadena ligera y pesada que comprenden secuencias de aminoácidos que son un 90 % idénticas a las SEQ ID NO: 2 y 3, respectivamente, o secuencias de aminoácidos que son un 95 % idénticas a las SEQ ID NO: 4 y 5, respectivamente. En una realización, el anticuerpo monoclonal comprende regiones variables de cadena ligera y pesada que comprenden secuencias de aminoácidos que son un 90 % idénticas a las SEQ ID NO: 2 y 3, respectivamente, o secuencias de aminoácidos que son un 90 % idénticas a las SEQ ID NO: 4 y 5, respectivamente. En una realización, el anticuerpo comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 2 y 3, respectivamente, o en las SEQ ID NO: 4 y 5, respectivamente. El anticuerpo monoclonal divulgado en el presente documento comprende cadenas ligeras y pesadas que comprenden secuencias de aminoácidos que son un 90 % idénticas a, o un 91 % idénticas a, o un 92 % idénticas a, o un 93 % idénticas a, o un 94 % idénticas a, o un 95 % idénticas a, o un 96 % idénticas a, o un 97 % idénticas a, o un 98 % idénticas a, o un 99 % idénticas a la SEQ ID NO: 6 y un 90 % idénticas a, o un 91 % idénticas a, o un 92 % idénticas a, o un 93 % idénticas a, o un 94 % idénticas a, o un 95 % idénticas a, o un 96 % idénticas a, o un 97 % idénticas a, o un 98 % idénticas a, o un 99 % idénticas a la SEQ ID NO: 7, respectivamente, o secuencias de aminoácidos que son un 90 % idénticas a, o un 91 % idénticas a, o un 92 % idénticas a, o un 93 % idénticas a, o un 94 % idénticas a, o un 95 % idénticas a, o un 96 % idénticas a, o un 97 % idénticas a, o un 98 % idénticas a, o un 99 % idénticas a la SEQ ID NO: 8 y un 90 % idénticas a, o un 91 % idénticas a, o un 92 % idénticas a, o un 93 % idénticas a, o un 94 % idénticas a, o un 95 % idénticas a, o un 96 % idénticas a, o un 97 % idénticas a, o un 98 % idénticas a, o un 99 % idénticas a la SEQ ID NO: 9, respectivamente. El anticuerpo monoclonal divulgado adicionalmente comprende cadenas pesadas y ligeras que comprenden secuencias de aminoácidos que son un 95 % idénticas a las SEQ ID NO: 6 y 7, respectivamente, o secuencias de aminoácidos que son un 95 % idénticas a las SEQ ID NO: 8 y 9, respectivamente. El anticuerpo monoclonal divulgado en el presente documento comprende cadenas pesadas y ligeras que comprenden secuencias de aminoácidos que son un 90 % idénticas a las SEQ ID NO: 6 y 7, respectivamente, o secuencias de aminoácidos que son un 90 % idénticas a las SEQ ID NO: 8 y 9, respectivamente. El anticuerpo monoclonal divulgado en el presente documento comprende cadenas pesadas y ligeras que comprenden secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 6 y 7, respectivamente. El anticuerpo monoclonal divulgado en el presente documento comprende CDR que comprenden secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 y 16. El anticuerpo anti-BLyS divulgado en el presente documento se selecciona del grupo de belimumab, tabalumab, y una mezcla de los mismos. En una realización, el anticuerpo anti-BLyS comprende las secuencias de cadena pesada y ligera establecidas en las SEQ ID NO: 6 y 7, respectivamente.
- 50 En una realización, la formulación farmacéutica según la presente invención comprende una concentración de anticuerpo monoclonal de 200 ± 20 mg/ml. En una realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 200 mg/ml. En una realización, el anticuerpo anti-BLyS se coadministra de forma concomitante o secuencial con un corticosteroide. En una realización, el corticosteroide se selecciona del grupo que consiste en prednisona, prednisolona, hidrocortisona, metilprednisolona y dexametasona. En una realización, el corticosteroide es prednisona. En un aspecto, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad o trastorno susceptible de tratamiento con un anticuerpo anti-BLyS. En una realización, la presente invención se refiere

a un método para tratar una enfermedad o afección que es susceptible de tratamiento con un anticuerpo anti-BLyS en un sujeto que comprende administrar una formulación según la presente invención a un sujeto en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o afección. En una realización, la enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico, vasculitis por anticuerpos contra el citoplasma de neutrófilos (ANCA), nefritis 5 lúpica, síndrome de Sjögren primario, trombocitopenia inmunitaria crónica, miastenia grave, macroglobulinemia de Waldenström sintomática, desensibilización inmunitaria de pacientes que esperan un trasplante de riñón, nefropatía membranosa, esclerosis sistémica, artritis reumatoide, mieloma múltiple, esclerosis múltiple e insuficiencia renal. En otra realización, la enfermedad o afección es lupus eritematoso sistémico. En otro aspecto, la presente invención proporciona una formulación para su uso en el tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en 10 lupus eritematoso sistémico, vasculitis por anticuerpos contra el citoplasma de neutrófilos (ANCA), nefritis lúpica, síndrome de Sjögren primario, trombocitopenia inmunitaria crónica, miastenia grave, macroglobulinemia de Waldenström sintomática, desensibilización inmunitaria de pacientes que esperan un trasplante de riñón, nefropatía membranosa, esclerosis sistémica, artritis reumatoide, mieloma múltiple, esclerosis múltiple e insuficiencia renal. En otro aspecto, la presente invención proporciona una formulación para su uso en el tratamiento del lupus eritematoso 15 sistémico. En el presente documento se divulga el uso de una formulación en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico, vasculitis por anticuerpos contra el citoplasma de neutrófilos (ANCA), nefritis lúpica, síndrome de Sjögren primario, trombocitopenia inmunitaria crónica, miastenia grave, macroglobulinemia de Waldenström sintomática, desensibilización inmunitaria de pacientes que esperan un trasplante de riñón, nefropatía membranosa, esclerosis sistémica, artritis reumatoide, mieloma múltiple, esclerosis múltiple e insuficiencia renal. En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso 20 de una formulación en la preparación de un medicamento para el tratamiento del lupus eritematoso sistémico.

En un aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende uno o más viales que contienen la formulación de la presente invención divulgada e instrucciones para la administración subcutánea de la formulación a un paciente. 25 En una realización, el kit comprende además un dispositivo de inyección para la administración subcutánea de la formulación a un paciente.

En una realización, la presente invención se refiere a un dispositivo de inyección que comprende una formulación de anticuerpo anti-BLyS estable descrita en el presente documento. Para suministro subcutáneo, la formulación puede 30 administrarse a través de un dispositivo adecuado, tal como (pero sin limitación) una jeringa; un dispositivo de inyección (por ejemplo, el dispositivo INJECT-EASE™ y GENJECT™); una bomba de infusión (tal como, por ejemplo, Accu-Chek™); una pluma inyectora (tal como la GENPEN™); o un dispositivo sin aguja (p. ej., MED-DECTOR™ y BIOJECTOR™).

35 La formulación farmacéutica según la invención está esencialmente exenta de partículas visibles (inspección por el ojo humano). Las partículas subvisibles (medidas por oscurecimiento de la luz) deben cumplir los siguientes criterios: número máximo de partículas $\geq 10 \mu\text{m}$ por vial-> 6000; número máximo de partículas $\geq 25 \mu\text{m}$ por vial-> 600.

40 La formulación farmacéutica del anticuerpo anti-BLyS farmacéuticamente activo según la invención se puede administrar como inyección subcutánea, por lo que la administración se repite varias veces con intervalos de tiempo de 1, 2, 3 o 4 semanas. En una realización, la formulación farmacéutica del anticuerpo anti-BLyS farmacéuticamente activo se administra una vez por semana o una vez cada dos semanas. En la mayoría de los casos, el volumen total del líquido de inyección se administra en un período de tiempo de 1 a 10 minutos, preferentemente 2 a 6 minutos, lo más preferentemente 3 ± 1 minutos.

45 Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada del anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a tratar, como se ha definido anteriormente, de la gravedad y de la evolución de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, en la terapia anterior, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al anticuerpo y del criterio del médico responsable. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente una vez o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a 50 mg/kg de peso corporal o más específicamente entre aproximadamente 0,1 mg/kg a 20 mg/kg de peso corporal) del anticuerpo es una dosis inicial con potencial terapéutico para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones distintas o mediante infusión continua. Más específicamente, la dosificación del anticuerpo estará en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg de anticuerpo/kg de peso corporal a aproximadamente de 10 mg de anticuerpo/kg de peso corporal.

50 En el presente documento se divulga un artículo de fabricación que contiene la formulación farmacéutica divulgada y proporciona instrucciones para su uso. Este artículo de fabricación comprende un recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales (por ejemplo, viales de dos o múltiples cámaras), jeringas (como jeringas de dos o múltiples cámaras) y tubos de ensayo. Los recipientes pueden conformarse a partir de diversos materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene la formulación y la etiqueta sobre, o asociada con, el recipiente puede indicar instrucciones de uso. El recipiente que contiene la formulación puede ser un vial de usos múltiples, lo que permite administraciones repetidas (por ejemplo, de 2 a 6 administraciones) de la formulación reconstituida. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista

comercial y del usuario, incluyendo otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

- 5 El anticuerpo que se formula según la presente invención se prefiere que sea esencialmente puro y se desea esencialmente homogéneo. Un anticuerpo "esencialmente puro" significa una composición que comprende al menos aproximadamente un 90 % en peso del anticuerpo, basándose en el peso total de la composición, preferentemente al menos aproximadamente un 95 % en peso. Un anticuerpo "esencialmente homogéneo" significa una composición que comprende al menos un 99 % en peso de anticuerpo, basándose en el peso total de la composición.
- 10 La invención se entenderá de forma más completa con referencia a los siguientes ejemplos. Son meramente ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. No se prevé que pequeñas variaciones en el procedimiento, p. ej. pequeños cambios en el tiempo, temperatura, cantidad, concentración, escala, etc., afecten al resultado de los experimentos. Todas las citas de bibliografía y patentes se incorporan en el presente documento como referencia.

- 15 15 Los Ejemplos se ilustran adicionalmente mediante las figuras 1-20.

Ejemplos

- 20 Ejemplo 1: formulaciones de belimumab

Cierre de recipientes

- 25 En todos los estudios se utilizaron viales Schott tipo I con tapones Daikyo D21-7S Flurotec® y sellos de aluminio de tipo flip off, a menos que se indique lo contrario. Esta combinación de vial y tapón se recomienda como configuración de fase 1. Las muestras de estabilidad a largo plazo que se almacenaron a > 2-8 °C utilizaron jeringas Gerresheimer de 1,0 ml de largo, 29G, de pared delgada, de aguja fina, precargadas con protectores de aguja Stelmi 4800 y émbolos Daikyo W4023 Flurotec®, y se ajustaron al vacío con una capa de nitrógeno. Las muestras a < 2-8 °C se introdujeron en viales criogénicos. Procedimientos de manipulación de productos

- 30 30 Antes de todos los experimentos, belimumab se filtró de forma estéril con un filtro de 0,22 µm y se introdujo de manera aséptica en los cierres de los recipientes elegidos. Todas las muestras de estabilidad se protegieron de la luz durante el almacenamiento.

- 35 Selección de excipientes

Se utilizaron excipientes multifarmacopeicos, obligatorios para la fabricación GMP BDS y FDP, cuando fue posible en los estudios de selección y se usaron para todas las formulaciones en el estudio de estabilidad a largo plazo.

- 40 40 La tabla 2 proporciona una lista de las formulaciones sometidas a prueba.

Tabla 2

Identificador	Descripción de la formulación		
	Conc. (mM) de amortiguador	Conc. (mM) de excipiente estabilizante	pH
1	Histidina 10 mM	NaCl 140 mM	6,0
2	Histidina 10 mM	Sacarosa 280 mM	6,0
3	Histidina 10 mM	Sacarosa 140 mM, NaCl 70 mM	6,0
4	Histidina 10 mM	MgCl ₂ 5,4 mM, NaCl 130 mM	6,0
5	Histidina 10 mM	Arg 25 mM, NaCl 115 mM	6,0
6	Histidina 10 mM	Sorbitol 280 mM	6,0
7	Histidina 10 mM	Arg 25 mM, MgCl ₂ 5,4 mM, NaCl 105 mM	6,0
8	Succinato 10 mM	NaCl 140 mM	6,0

Estabilidad a largo plazo

- 45 45 Agregación dependiente de la concentración en la formulación 1

- Como se esperaba, la agregación aumentó con la concentración de proteína (tabla 3, figura 1). La tasa de agregación se duplica aproximadamente entre 100 mg/ml y 260 mg/ml, pero incluso a 260 mg/ml solo daría lugar a un aumento de aproximadamente el 1 % en la agregación durante 3 años a 2-8 °C a 200 mg/ml de belimumab. Obsérvese que la cantidad inicial de agregación observada por SEC-HPLC aumenta a medida que aumenta la concentración de proteína, aunque solamente en aproximadamente un 0,1 % (fila de 0 meses de la tabla 3).

Tabla 3 Efecto de la concentración de proteína sobre el % de agregado

Mes	100 mg/ml	140 mg/ml	180 mg/ml	220 mg/ml	260 mg/ml
0	0,47 %	0,50 %	0,54 %	0,58 %	0,60 %
1	0,47 %	0,51 %	0,52 %	0,58 %	0,62 %
2	0,54 %	0,61 %	0,64 %	0,75 %	0,78 %
4	0,53 %	0,59 %	0,63 %	0,72 %	0,77 %
6	0,58 %	0,63 %	0,70 %	0,76 %	0,84 %
Tasa/Mes	0,018 %	0,021 %	0,027 %	0,030 %	0,040 %

Selección de candidatos de formulación a largo plazo

5

Basándose en los siguientes resultados, las formulaciones con potencial terapéutico se redujeron a las formulaciones 1 y 5 después de la evaluación de los datos de 3 meses, y después se eligió la formulación 5 como la formulación final después de 5 ¼ meses.

10 Aspecto, pH y osmolalidad

Todas las muestras eran de color amarillo pálido, opalescente, y estaban exentas de partículas visibles en todo momento hasta los 5 ¼ meses. El producto farmacéutico terminado en las ocho formulaciones en las tres concentraciones coincidió más estrechamente con el patrón de color Y5 cuando se sometió a prueba por colorimetría en el punto de tiempo inicial. Todas las muestras de FDP en las formulaciones de histidina/NaCl (en lo sucesivo en el presente documento, formulación 1) e histidina/NaCl/arginina (en lo sucesivo en el presente documento, formulación 5) también coincidieron con el patrón Y5 después de 3 y 5 ¼ meses de almacenamiento a 2-8 °C. La turbidez de las muestras con estabilizantes de azúcar (sacarosa y sorbitol) fue significativamente menor que todas las demás muestras, que osciló entre 29 y 38 NTU en el punto de tiempo inicial y de 3 meses. La turbidez también aumentó en las muestras que contenían NaCl a medida que disminuía la concentración de proteína. Solamente se sometieron a prueba las formulaciones 1 y 5 después de 5 ¼ meses a 2-8 °C y no mostraron ninguna respuesta a la formulación, concentración o tiempo (figura 2).

Tabla 4 Turbidez de muestras de estabilidad a largo plazo después de 3 meses de almacenamiento a 2-8 °C

	Turbidez (NTU)					
	Concentración alta (~200 mg/ml)		Concentración media (~165 mg/ml)		Concentración baja (~125 mg/ml)	
	Mes 0	Mes 3	Mes 0	Mes 3	Mes 0	Mes 3
Hist/NaCl (formulación 1)	33	33	37	37	37	37
Hist/sacarosa (2)	25	23	24	24	22	23
Hist/sacarosa/NaCl (3)	30	30	33	33	34	35
Hist./NaCl/MgCl ₂ (4)	31	31	35	36	36	37
Hist/NaCl/Arg (formulación 5)	29	28	33	33	33	34
Hist/sorbitol (6)	27	27	24	26	26	26
Hist/NaCl/Arg/MgCl ₂ (7)	29	29	32	31	32	33
Succinato/NaCl (8)	31	31	36	35	36	37

25

El pH de todas las muestras osciló entre 6,1 y 6,3 en el punto de tiempo inicial y no cambió en las formulaciones 1 y 5 después de 5 ¼ meses (los datos de la formulación 5 se muestran en la tabla 13). La osmolalidad se sometió a prueba solamente en el punto de tiempo inicial; todas las muestras fueron 299 +/- 17 mOsm/kg.

30 Viscosidad y jeringabilidad

Las formulaciones que contienen azúcar (sacarosa, sorbitol) mostraron las viscosidades más altas, seguidas de la formulación de succinato/cloruro de sodio (tabla 5). El resto de las muestras que contenían sal eran comparables. La viscosidad aumentó exponencialmente a medida que aumentaba la concentración de proteína en las formulaciones 1 y 5 (figura 3).

Tabla 5 Viscosidad de muestras de estabilidad a largo plazo en T0

Muestra	Viscosidad (mm ² /s)		
	Concentración alta (~200 mg/ml)	Concentración media (~165 mg/ml)	Concentración baja (~125 mg/ml)
Hist/NaCl (formulación 1)	10,2	5,8	3,6

Hist/sacarosa	17,4	7,7	4,9
Hist/sacarosa/NaCl	13,4	7,9	3,9
Hist/NaCl/MgCl ₂	12,8	5,6	3,4
Hist/NaCl/Arg (formulación 5)	13,0	5,8	3,8
Hist/sorbitol	21,0	7,6	4,3
Hist/NaCl/Arg/MgCl ₂	12,8	5,6	3,5
Succinato/NaCl	15,3	6,6	3,8

La jeringabilidad, medida como la fuerza necesaria para suministrar 1 ml a través de la aguja de pared delgada 29G en 10 segundos, mostró tendencias similares en el punto de tiempo inicial. Después de un 5 % de los meses, solo se sometieron a prueba las formulaciones 1 y 5, y no se observó un aumento significativo en la jeringabilidad a lo largo del tiempo a 2-8 °C. También se sometió a prueba la jeringabilidad durante 20 segundos en una de cada jeringa en el punto de tiempo del 5 % mensual, y se demostró que la fuerza de suministro disminuía hasta en un 40 % cuando el tiempo de suministro se duplicaba. Aunque no se ha sometido a prueba, la fuerza de suministro también se puede disminuir aumentando el calibre de la aguja.

10 Tabla 6 Jeringabilidad de muestras de estabilidad a largo plazo en T0 y un 5 % de los meses

		Jeringabilidad (N)		
Muestra y tiempo de suministro	Muestra	Concentración alta (~200 mg/ml)	Concentración media (~165 mg/ml)	Concentración baja (~125 mg/ml)
Punto de tiempo inicial	Hist/NaCl (formulación 1)	21,9	14,5	12,0
	Hist/sacarosa	31,3	18,2	13,8
	Hist/sacarosa/NaCl	25,7	17,5	12,7
	Hist/NaCl/MgCl ₂	23,8	14,1	11,1
Suministro en 10 segundos	Hist/NaCl/Arg (formulación 5)	24,4	16,3	11,5
	Hist/sorbitol	35,7	18,0	12,6
	Hist/NaCl/Arg/MgCl ₂	25,0	16,1	10,9
	Succinato/NaCl	28,3	14,6	11,7
Muestra a los 5 1/4 meses, 2-8 °C	Hist/NaCl (formulación 1)	24,4	16,1	10,6
Suministro en 10 segundos	Hist/NaCl/Arg (formulación 5)	24,2	16,7	10,8
Muestra al 5 % de los meses, 2-8 °C	Hist/NaCl (formulación 1)	14,4	10,0	9,4
Suministro en 20 segundos	Hist/NaCl/Arg (formulación 5)	16,2	11,1	6,4

15 Las fuerzas necesarias para administrar los fármacos a través de siete inyectores de pluma comercializados, que son más similares a las jeringas precargadas porque requieren una fuerza de accionamiento manual, son similares a la fuerza para belimumab a 200 mg/ml (tabla 7). Los tiempos de inyección variaron debido a los diferentes volúmenes y diámetros de los recipientes, que se enumeran en la tabla 7 para comparación. Para finalizar, un estudio de la Universidad de Nottingham encargado por el Departamento de Comercio e Industria del Reino Unido ha demostrado que estando sentadas, 59 mujeres entre las edades de 16 y 90 eran capaces de aplicar 53,7 a 237,7 N de fuerza estática hacia abajo a nivel de la cadera con el pulgar. Aunque ni los datos del inyector de pluma ni el estudio de fuerza son correlaciones perfectas para usar una jeringa precargada, ambos conjuntos de datos generan confianza en que la viscosidad y la jeringabilidad de 200 mg/ml de belimumab no son prohibitivas para la administración manual. Sin embargo, la fuerza necesaria para administrar 200 mg/ml de belimumab desde una jeringa precargada de 1 ml de largo a través de una aguja de pared delgada 29G está cerca del límite deseable para la inyección manual, y se preferiría una aguja más ancha.

Tabla 7 Fuerzas de inyección de plumas comercialmente disponibles a 80 mm/min

Pluma	Aguja provista	Empresa	Indicación	Fuerza de inyección (N)	Tiempo de suministro (segundos)
Gonal-f RFF	Ypsomed Penfine 29Gx1/2"	EMD Serono	Infertilidad	22,3	5,3
Lantus SoloStar	Ninguna (se recomienda BD)	Sanofi-Aventis	diabetes de tipo 2 o de tipo 1	6,4*	11,3
Lantus SoloStar	BD Microfine 30Gx8mm	Schering Corporation	hepatitis C crónica	21,1	7,1
Lantus SoloStar	Ninguna (se recomienda BD)	Eli Lilly	diabetes	24,9*	7,1
Lantus SoloStar	Ninguna (se recomiendan 29, 30, 31G)	Amylin Pharmaceuticals Eli Lilly	diabetes de tipo 2	13,4*	4,1
Lantus SoloStar	Ninguna (se recomienda Novofine)	Novo Nordisk	Tratamiento con GH	13,8*	9,4
Lantus SoloStar	Ninguna (se recomienda BD)	Eli Lilly	osteoporosis	24,1*	5,3

* Suministrada usando una aguja Ypsomed Penfine 29Gx12.7mm

Variantes de tamaño

Datos de SEC-HPLC de 3 meses

5

La agregación, observada mediante SEC-HPLC, fue la vía dependiente de la concentración predominante para belimumab en todas las formulaciones. El porcentaje de fragmentación (observado como un hombro posterior) fue variable entre un 0,1 y 0,2 %, pero no cambió a lo largo del tiempo (respaldado por datos del 5 % de los meses).

10

Después de 3 meses a 2-8 °C, se observaron claras diferencias en la tasa de agregación (figura 4) entre belimumab formulado en las ocho formulaciones. La formulación 5 (histidina/NaCl/arginina) mostró la tasa más baja durante tres meses, particularmente a 200 mg/ml (azul en la figura 4). Esto se vio respaldado por las tendencias aceleradas a 200 mg/ml (figura 5). El succinato fue el peor estabilizante a bajas temperaturas, pero el mejor a temperaturas elevadas. Muchas de las otras formulaciones de sal y azúcar, incluyendo la formulación 1 (histidina/NaCl), mostraron porcentajes de agregados absolutos y tasas de agregación similares.

15

Datos de SEC-HPLC a los 5 1/4 meses

20

Se evaluó belimumab en las formulaciones 1 y 5 al 5 % de los meses. Las tendencias observadas a los 3 meses continuaron, con la formulación que contiene arginina que muestra una menor tasa de agregación, especialmente a la concentración más alta de 200 mg/ml. La figura 6 muestra las tasas de agregación después del 5 % de los meses a una temperatura hasta 25 °C, y muestra que la formulación de arginina (recuadros blancos en el gráfico) amortigua significativamente la agregación en comparación con la formulación 1 (recuadros rellenos). Un análisis más detallado de las tasas de agregación a varias temperaturas en la figura 7 muestra como de consistente muestra la formulación 5 (líneas discontinuas) una tasa de agregación más baja que la formulación 1 (líneas continuas). Si la tasa de agregación a 2-8 °C observada hasta el 5 % de los meses se mantiene durante 3 años, FDP solo aumentaría aproximadamente un 1,2 %.

25

CGE

30

La electroforesis en gel capilar reductor de las formulaciones 1 y 5 no mostró tendencias después del 5 % de los meses de almacenamiento a diversas temperaturas (tasas mostradas en la figura 8). Por lo tanto, la reticulación y el corte no dependen de la concentración o la formulación.

35

Heterogeneidad de carga

El intercambio de iones indica que ni la concentración ni la adición de arginina a una formulación de sal amortiguada con histidina afecta a las variantes de carga (figura 9). Aunque las variantes ácidas aumentan a lo largo del tiempo a temperaturas elevadas, se observó poco o ningún cambio en las variantes después del 5 % de los meses.

40

Oxidación

No se observaron cambios significativos en la oxidación entre ninguna de las 8 formulaciones después de 3 meses de almacenamiento a 2-8 °C (datos no mostrados). Después del 5 % de los meses, al comparar datos de -80 °C y 15 °C,

no se observaron diferencias en la oxidación entre las formulaciones 1 y 5 o entre las tres concentraciones en cualquiera de las formulaciones (figura 10). Se observó aproximadamente un 1,0 % de oxidación adicional en todas las muestras después del 5 % de los meses de almacenamiento a 25 °C, y aproximadamente un 4,5 % de oxidación adicional a 40 °C.

5

Mapeo de péptidos

No se observaron diferencias entre las muestras de 200 mg/ml de la formulación 1 a -80 °C y 2-8 °C o el patrón de referencia después del 5 % de los meses (figura 11). La muestra a 25 °C mostró un pequeño aumento en la desamidación de T4, como se esperaba a temperaturas aceleradas. De manera similar, la muestra de la formulación 5 mostró desamidación de T4 solamente a 25 °C, pero también mostró alturas de pico inconsistentes en otros picos de péptidos diferentes (T33, T34 y T5 de la cadena pesada, T3 de la cadena ligera de la figura 12). Estas alturas de pico no mostraron tendencia con la temperatura, por lo que se sospechó que la arginina interfería en la digestión.

10

Para determinar si la interferencia de la arginina era la causa de la variabilidad, se añadió arginina 0, 25 y 50 mM a una muestra de la formulación 1 que había pasado por el paso de desalinización del método. A continuación, las tres muestras se analizaron a través de las etapas restantes, que incluyen la digestión con tripsina. Los mismos picos peptídicos que mostraron variabilidad en las muestras de estabilidad mostraron respuestas que se correlacionaron con la concentración de arginina (figura 13). Esto indica que es posible que la arginina no siempre se elimine por completo en la etapa de desalinización y explica la variación independiente de la temperatura observada en los mapas de péptidos de las muestras formuladas en la formulación 5. Debido a que no se observaron otras modificaciones en los mapas de péptidos, se puede suponer que a pesar de las diferencias en los mapas, las formulaciones 1 y 5 no tuvieron ninguna degradación observable después del 5 % de los meses a 2-8 °C, y solamente una degradación mínima después del 5 % de los meses a 25 °C.

20

Potencia

Belimumab permanece biológicamente activo después del almacenamiento a 2-8 °C durante 3 meses en la formulación 1 o la formulación 5 entre 125 y 200 mg/ml, o después del 5 % de los meses en la formulación 5 a 200 mg/ml (tabla 8).

Tabla 8 Potencia relativa después de la estabilidad a 2-8 °C

	% de potencia relativa	
	3 meses	5 ¼ meses
200 mg/ml de formulación 5	102 %	118 %
125 mg/ml de formulación 5	106 %	
200 mg/ml de formulación 1	90 %	
125 mg/ml de formulación 1	102 %	

Evaluación de congelación/descongelación

35

Las muestras expuestas a 5 ciclos rápidos de congelación/descongelación entre -40 °C y 2-8 °C tuvieron una cantidad similar de agregación que las muestras de control de -40 °C, lo que indica que la congelación/descongelación rápida no es una preocupación ni en la formulación 1 ni en la formulación 5 (tabla 9).

40

Tabla 9 Resultados de SEC-HPLC de belimumab expuesto a congelación/descongelación rápida

	% de agregado	
	Formulación 1	Formulación 5
ctrl a 2-8 °C	0,6	0,6
ctrl a -20 °C	0,8	0,8
ctrl a -40 °C	0,6	0,7
control a -80 °C	0,6	0,6
5X ciclo a -40/2-8 °C	0,7	0,7

Las muestras expuestas a 3 ciclos lentos de congelación/descongelación mostraron un aumento del 0,2 % en el nivel de agregado en comparación con los controles líquidos (tabla 10).

45

Tabla 10 Resultados de SEC-HPLC de belimumab expuesto a congelación/descongelación lenta

Muestra	% de agregado	% de pico principal	% de recorte
Control líquido de la formulación 1	0,7	99,1	0,2
Congelación/descongelación lenta de la formulación 1	0,9	98,9	0,2
Control líquido de la formulación 5	0,6	99,2	0,1
Congelación/descongelación lenta de la formulación 5	0,8	99,1	0,2

DSC

- Se usó calorimetría para evaluar la transición vítreo (T_g') por debajo del punto de congelación de cada formulación y para determinar si se formó un eutéctico por debajo del punto de congelación. El eutéctico de cloruro de sodio: agua puede formarse por debajo de aproximadamente -21 °C, y la cristalización eutéctica de los excipientes puede afectar la calidad del producto al introducir interacciones en la superficie cristalina y cambiar el entorno químico local en el concentrado congelado que contiene proteína. El almacenamiento por debajo de T_g' puede mejorar la estabilidad aumentando el tiempo de relajación y reduciendo la degradación asociada.
- Las formulaciones 1 y 5 de alta concentración de belimumab tuvieron un comportamiento similar con respecto a las transiciones por debajo del punto de congelación (tabla 11). Para la formulación 1, T_g' osciló entre -23 °C (congelación más rápida) y -33 °C (congelación más lenta). Para la formulación 5, T_g' osciló entre -22 °C (congelación más rápida) y -32 °C (congelación más lenta). Para ambas formulaciones, se observó una endotermia eutéctica solo después del ciclo térmico con múltiples etapas de recocido a -23 °C. El eutéctico probablemente era cloruro de sodio - agua.

Estos resultados indican que las transiciones térmicas por debajo del punto de congelación de estas formulaciones son sensibles al historial térmico de la muestra. Esto probablemente se deba al alto contenido de sólidos disueltos y a la presencia de cloruro de sodio, que puede afectar a la T_g' en la fase proteica/amorfica. Los resultados, junto con los datos de estabilidad a -80 °C y -40 °C de la Sección 5.2, también indican que el almacenamiento de BDS a < -40 °C y protegido de la luz es suficiente para belimumab en la formulación 5.

Tabla 11 Resultados de DSC para belimumab en la formulación 5 y la formulación 1

Muestra	Formulación 1:	Formulación 5:
Congelación rápida	Masa de muestra (mg)	16,5
	T_g'	-23 °C
	Endotermia eutéctica	No se observó eutéctico
Recocido de congelación media a -40 °C	Masa de muestra (mg)	15,7
	T_g'	-27 °C
	Endotermia eutéctica	No se observó eutéctico
Recocido de congelación media a -23 °C	Masa de muestra (mg)	16,9
	T_g'	-25 °C
	Endotermia eutéctica	No se observó eutéctico
Congelación lenta a -60 °C	Masa de muestra (mg)	17,7
	T_g'	Débil -33 °C
	Endotermia eutéctica	No se observó eutéctico
Ciclo térmico (-80/-23°C con recocido)	Masa de muestra (mg)	15,3
	T_g'	Después del ciclo, débil -31 °C
	Endotermia eutéctica	Entre -16 °C y -12 °C (0,6 J/g)
		Entre -16 °C y -12 °C (0,7 J/g)

Evaluación de la agitación

Después de 48 horas de agitación a 250 rpm, no hubo cambios significativos en la pureza por SEC-HPLC ni en la turbidez ni en el vial ni en la jeringa en el intervalo de concentraciones de polisorbato estudiado (tabla 12). Se demostró que el polisorbato 80 al 0,01 % es eficaz y fuerte en la formulación 5 como protector contra la agitación tanto en un vial como en una jeringa.

5

Tabla 12 SEC-HPLC y turbidez de belimumab en la formulación 5 después de agitar a 250 rpm

Cierre de recipientes	Muestra	% pico principal por SEC			Turbidez (NTU)	
		0 h.	24 h.	48 h.	0 h.	48 h.
Vial	Control (sin agitación)	99,4	99,3	99,3	37	38
	PS80 bajo (0,005 %)	99,4	99,3	99,3	35	35
	PS80 objetivo (0,01 %)	99,4	99,3	99,3	33	37
	PS80 alto (0,02 %)	99,4	99,4	99,4	30	33
	Control (sin agitación)	99,4	99,3	99,3	37	38
	PS80 bajo (0,005 %)	99,4	99,3	99,3	35	35
Jeringa	PS80 objetivo (0,01 %)	99,4	99,3	99,3	33	34
	PS80 alto (0,02 %)	99,4	99,3	99,4	30	32

Conclusiones

- 10 Se eligió una formulación para la administración subcutánea de belimumab a 200 mg/ml en función de su capacidad para minimizar las tasas de la vía de degradación primaria (formulación 5; 0,65 mg/ml de L-histidina, 1,2 mg/ml de monoclórhidrato de L-histidina, 6,7-7,3 mg/ml de cloruro de sodio, 5,3 mg/ml de clorhidrato de L-arginina, 0,1 mg/ml de polisorbato 80, pH 6,0; o, como alternativa, histidina 10 mM, cloruro de sodio 115 mM, monoclórhidrato de L-arginina 25 mM, polisorbato 80 al 0,01 % (p/v), pH 6,0). Se demostró que la tasa de agregación (~0,03 %/mes a 2-8 °C) aumentaba con la concentración de belimumab, pero se inhibió con el uso de arginina 25 mM. La tasa de desamidación fue de aproximadamente 0,2 %/mes a 2-8 °C. La formulación de 200 mg/ml tiene una fuerza de suministro aceptable para suministro manual o con autoinyector utilizando una jeringa larga de 1 ml y una aguja de pared delgada 29G o más ancha. Se demostró que los perfiles de congelación/descongelación y el almacenamiento a -80 °C y -40 °C son aceptables, y el producto no es susceptible a la agitación.
- 15 20
- 25 Se realizaron estudios de estabilidad de GMP a largo plazo en 200 mg/ml del producto farmacéutico final de belimumab en la formulación 5 (1,0 ml introducido en una jeringa BD larga de 1,0 ml). Hasta la fecha, hay 42 meses de datos de estabilidad de GMP a la temperatura de almacenamiento prevista de 2-8 °C (tabla 14). Los resultados indican que la formulación 5 proporciona una estabilidad adecuada a belimumab con perfiles de degradación aceptables observados a la temperatura de almacenamiento prevista de 2-8 °C (tabla 14).

ES 2 927 990 T3

Tabla 13. Estabilidad a largo plazo de belimumab en la formulación 5 a 200 mg/ml

Tiempo (Mes)	Temperatura (°C)	Apariencia	Colorimetría	pH	Turbidez (NTU)	% de agregado por SEC	% de pureza por SEC	% de fragmentos por SEC	% de Ácido principal por IEC	% de Hombro báscido por IEC	Básico por IEC (con/sin hombro)	% de Oxidación de HC por RP	% de pureza por CGE	Potencia (% de pureza relativa)
0	NID	OPF	Y5	6,3	29	0,6	99,2	0,2	12,9	78,5	5,2	8,6	1,8	95,0
	-80			6,2		0,6	99,4	0	12,6	79,4	5,0	8,0	3,8	93,1
	-40			6,2		0,6	99,3	0,1	12,7	79,6	4,8	7,7	3,8	93,8
5	5	OPF	Y5	6,3	29	0,7	99,1	0,2	13,0	79,3	4,9	7,7	2,2	92,4
	15		Y5	6,3		1,0	98,8	0,2	15,6	76,9	4,6	7,5	4,1	95,7
3	25		Y5	6,1		1,2	98,5	0,4	25,7	68,1	3,9	6,2	4,6	93,2
	-80			6,2		0,6	99,4	0,0	13,9	78,2	4,7	7,9	2,1	94,7
	-40			6,2		0,7	99,3	0,0	12,2	78,9	5,6	9,0	2,0	95,6
5	5	OPF	Y5	6,2	37	0,7	99,2	0,1	12,9	78,2	5,1	8,8	2,3	94,3
	15			6,2		1,0	98,8	0,1	18,1	73,1	5,5	8,8	2,4	92,8
	25			6,2		1,4	98,2	0,4	34,2	58,5	4,1	7,3	3,3	93,1
5,25	40			6,2		9,7	88,1	2,2	92,9	2,2	3,3	4,8	6,4	83,7
9	5	OPF	Y5			0,9	99,1	0,1	14,6	78,3	4,2	7,2	2,6	96,4

Tabla 14. Datos de estabilidad según GMP de 200 mg/ml de Belimumab en la formulación 5 a la temperatura de almacenamiento prevista de 2-8 °C (1,0 ml en una botella de 1,0 ml)
Jeringa larga BD)

Prueba (método analítico)	Criterios de aceptación clínica	Tiempo (meses)										
		0	1	2	3	6	9	12	18	24	30	36
Apariencia [Inspección visual (Ph. Eur. 2.2.1 y 2.2.2)]	Solución incolora a amarillo pálido, de clara a opalescente, esencialmente exenta de partículas extrañas	OPF	OPF									
Heterogeneidad de carga (IE-HPLC)	Pico principal (MP): 64,3 - 89,7 % Picos ácidos (AP); Resultado indicado (X.X%)	MP: 75,6 AP: 13,2	MP: 75,3 AP: 13,4	MP: 74,9 AP: 13,6	MP: 74,7 AP: 14,1	MP: 74,1 AP: 14,9	MP: 72,0 AP: 16,3	MP: 72,3 AP: 16,2	MP: 69,4 AP: 17,7	MP: 69,2 AP: 20,1	MP: 68,3 AP: 20,8	MP: 68,3
Integridad del cierre del recipiente (fuga de tinte)	Superado								Superado	Superado	Superado	Superado
Volumen de suministro (USP <1> Ph. Eur. 2.9.17)	1,0-1,1 ml Volumen máximo: X.XX ml Volumen mínimo: X.XX ml	Máx: 1,06 Min: 1,04	Máx: 1,06 Min: 1,05	Máx: 1,06 Min: 1,05	Máx: 1,08 Min: 1,05	Máx: 1,07 Min: 1,05	Máx: 1,06 Min: 1,05	Máx: 1,06 Min: 1,05	Máx: 1,06 Min: 1,05	Máx: 1,06 Min: 1,04	Máx: 1,06 Min: 1,04	Máx. 1,07
Fuerzas de inyección (banco de prueba de fuerza de compresión)	Fuerza máxima de rotura: Resultado indicado (X.X N)	BLF: 7,7	BLF: 7,0	BLF: 7,8	BLF: 7,1	BLF: 7,5	BLF: 8,0	BLF: 8,1	BLF: 7,3	BLF: 6,8	BLF: 8,4	BLF: 9,5
pH [Electrodo de pH (USP <791> Ph. Eur. 2.2.3)]	Fuerza de extusión de pico máximo: Resultado indicado (X.X N)	PEF: 7,4	PEF: 9,1	PEF: 8,1	PEF: 8,6	PEF: 7,5	PEF: 7,6	PEF: 9,2	PEF: 9,3	PEF: 7,5	PEF: 9,9	PEF: 8,4
Potencia (inhibición de la unión)	6,0 +/- 0,4	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,1	6,0	6,0	6,1	6,1
Concentración de proteína (A280)	75 - 133 % de potencia relativa	105	105	96	98	99	108	93	105	96	98	98
	200 +/- 40 mg/ml	200	204	195	202	197	200	198	197	199	198	197

(continuación)

Prueba (método analítico)	Criterios de aceptación clínica	Tiempo (meses)											
		0	1	2	3	6	9	12	18	24	30	36	42
Pureza (SDS-PAGE: reducido con tinción azul de Coomassie)	>= 95 %	99	98	99	98	99	99	99	99	99	99	99	99
Pico principal (MP): >= 95,0 %	MP: 99,4	MP: 99,4	MP: 99,2	MP: 99,2	MP: 99,1	MP: 99,1	MP: 99,0	MP: 99,0	MP: 98,9	MP: 98,8	MP: 98,7	MP: 98,8	MP: 98,8
Pureza (SEC-HPLC)	Agregado (AG): Resultado indicado (X.X%)	AG: 0,5	AG: 0,6	AG: 0,7	AG: 0,7	AG: 0,8	AG: 0,8	AG: 0,9	AG: 1,0	AG: 1,0	AG: 1,1	AG: 1,1	AG: 1,0
Esterilidad (USP <71>, Ph. Eur. 2.6.1)	Fragmento (FG): Resultado indicado (X.X%)	FG: 0,1	FG: 0,0	FG: 0,0	FG: 0,1	FG: 0,2	FG: 0,1						
Materia con partículas subvisibles (USP <88>, Ph. Eur. 2.9.19)	Sin crecimiento	Sin crecimiento											
	Cumple con USP <788> y Ph. Eur. 2.9.19												
	<= 6000 partículas por recipiente >= 10 µm	62							45		290	176	179
	<= 600 partículas por recipiente >= 25 µm	6						0		12	16	7	10

Clave de apariencia: C = clara, 0 = opalescente; L = incolora, P = color amarillo pálido, (Y) = color amarillo; F = esencialmente exenta de partículas extrañas; X = otra fuerza de inyección; BLF= fuerza de rotura, PEF = fuerza de extrusión máxima,

ES 2 927 990 T3

Listado de secuencias

SEQ ID NO: 1 BLyS

MDDSTEREQS RLTSCCLKRE EMKLKECVSI LPRKESPSVR SSKDGKLLAA TLLLALLSCC
LTVVSFYQVA ALQGDLASLR AELQGHHAEK LPAGAGAPKA GLEEAPAVTA GLKIFEPPAP
GEQNSSQNSR NKRAVQGPEE TVTQDCLQLI ADSETPTIQK GSYTFPWLL SFKRGSALEE
KENKILVKET GYFFIYGQVL YTDXTYAMGH LIQRKKVHVF GDELSLVTLF RCIONMPETL
5 PNNSCYSAGI AKLEEGDELQ LAIPRENAQI SLDGDVTFFG ALKLL

SEQ ID NO: 2 VH de belimumab

QVQLQQSGAE VKPGSSVRV SCKASGGTFN NNAINWVRQA PGQGLEWMGG IIPMFGTAKY
SQNFQGRVAI TADESTGTAS MELSSLRSED TAVYYCARSR DLLLFPHHAL SPWGRGTMVT
VSS

10

SEQ ID NO: 3 VL de belimumab

SSELTQDPAV SVALGQTDRV TCQGDSLR SY YASWYQQKPG QAPVLVIYKG NNRPSGIPDR
FSGSSSGNTA SLTITGAQAE DEADYYCSSR DSSGNHWVFG GGTELTIVLG

15

SEQ ID NO: 4 VH de tabalumab

MKHLWFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIROPP
GKGLEWIGEI NHSGSTNYNP SLKSRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARGYYD
ILTGYYYYFD YWGQGTLVTV SS

SEQ ID NO: 5 VL de tabalumab

20

EIVLTQSPAT LSLSPLGERAT LSCRASQSVS RYLAWYQQKPG GQAPRLLIYD ASN RATGIPA
RFSGSGSGTD STLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPRTEFGQ GTKVEIKRT

SEQ ID NO: 6 Cadena pesada de belimumab

QVQLQQSGAE VKPGSSVRV SCKASGGTFN NNAINWVRQA PGQGLEWMGG IIPMFGTAKY
SQNFQGRVAI TADESTGTAS MELSSLRSED TAVYYCARSR DLLLFPHHAL SPWGRGTMVT
VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPABL
QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPCPAPEL
LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVV DVSHEDEPK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK
25 SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL PGK

SEQ ID NO: 7 Cadena ligera de belimumab

SSELTQDPAV SVALGQTDRV TCQGDSLR SY YASWYQQKPG QAPVLVIYKG NNRPSGIPDR
FSGSSSGNTA SLTITGAQAE DEADYYCSSR DSSGNHWVFG GGTELTIVLGQ PKAAPSVTLF
PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTPSKQS NNKYAASSYL
SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS

30

SEQ ID NO: 8 Cadena pesada de tabalumab

ES 2 927 990 T3

QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAYVGGFS GYYWSWIRQP PGKGLEWIGE INHSGSTNYN
PSIJKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARGYY DILTGYYYYF DYWGQGTLVT
VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL
QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TKTTCNVDH KPSQTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG
PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE
MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW
QEGRNFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 9 Cadena ligera de tabalumab

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLAZYQQKP GQAPRLLIYD ASN RATGIPA
RFSGSGSGTD STLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
5 SDEQLKSGTA SVVCLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSNTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEc

SEQ ID NO: 10 Forma soluble de BLyS

AVQGPEETVT QDCLQLIADS ETPTIQKGSY TFVPWLLSFK RGSALEEKEN KILVKETGYF
FIYGQVLYTD KTYAMGHLIQ RKKVHVFGDE LSLVTLFRCI QNMPETLPNN SCYSAGIAKL
EEGDELQLAI PRENAQISLD GDVTFFGALK LL
10 SEQ ID NO: 11 Belimumab
CDRH1 GGTFFNNNAIN

15 SEQ ID NO: 12 Belimumab
CDRH2 GIIPMFGTAK YSQNFQG

20 SEQ ID NO: 13 Belimumab
CDRH3 SRDLLLPH ALSP

25 SEQ ID NO: 14 Belimumab
CDRL1 QGDSSLRSYYA S

SEQ ID NO: 15 Belimumab
CDRL2 GKNNRPS

30 25 SEQ ID NO: 16 Belimumab
CDRL3 SSRDSSGNHW V

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> BLAKE-HASKINS, Angela MARSHALL, Tristan PERKINS, Melissa D. O'BERRY, Kristen CROTT, George H. PURI, Manasi DUNLEAVY, Donna M.

<120> FORMULACIÓN DE ANTICUERPOS

40 <130> PU65703

<140> Todavía sin asignar
<141> 15/05/2015

45 <150> 61/994427
<151> 16/05/2014

<150> 62/093734
<151> 18/12/2014

<150> 62/095181

ES 2 927 990 T3

<151> 22/12/2014

<160> 16

5 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 285

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> BLYS

15 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos identificada mediante técnicas de biología molecular.

<400> 1

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

20

<210> 2

<211> 123

<212> PRT

ES 2 927 990 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos identificada mediante técnicas de biología molecular.

5

<400> 2

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

10

<210> 3

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos identificada mediante técnicas de biología molecular.

<400> 3

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

20

<210> 4

<211> 142

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos identificada mediante técnicas de biología molecular.

30

<400> 4

ES 2 927 990 T3

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

5 <210> 5
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos identificada mediante técnicas de biología molecular.
<400> 5

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

15 <210> 6
<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos identificada mediante técnicas de biología molecular.
<400> 6

ES 2 927 990 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Asn Asn Asn
 20 25 30
 Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Met Phe Gly Thr Ala Lys Tyr Ser Gln Asn Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Ala Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Gly Thr Ala Ser
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Arg Asp Leu Leu Leu Phe Pro His His Ala Leu Ser Pro
 100 105 110
 Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450

ES 2 927 990 T3

<210> 7
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos identificada mediante técnicas de biología molecular.

10

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

<210> 8
<211> 450
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos identificada mediante técnicas de biología molecular.

20

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 195 200 205
 Asp His Lys Pro Ser Gln Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 210 215 220
 Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 9
 <211> 214
 <212> PRT

ES 2 927 990 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos identificada mediante técnicas de biología molecular.

5

<400> 9

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

10

<210> 10

<211> 152

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos identificada mediante técnicas de biología molecular.

<400> 10

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

Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu
 145 150

<210> 11
 <211> 10
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos identificada mediante técnicas de biología molecular.
 10 <400> 11

Gly Gly Thr Phe Asn Asn Asn Ala Ile Asn
 1 5 10

 15 <210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos identificada mediante técnicas de biología molecular.
 <400> 12

Gly Ile Ile Pro Met Phe Gly Thr Ala Lys Tyr Ser Gln Asn Phe Gln
 1 5 10 15
 25 Gly

 <210> 13
 <211> 14
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos identificada mediante técnicas de biología molecular.
 35 <400> 13

Ser Arg Asp Leu Leu Leu Phe Pro His His Ala Leu Ser Pro
1 5 10

5 <210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
10 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos identificada mediante técnicas de biología molecular.
<400> 14

Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
1 5 10

15 <210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
20 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos identificada mediante técnicas de biología molecular.
<400> 15

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

25 <210> 16
<211> 11
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia de aminoácidos identificada mediante técnicas de biología molecular.
35 <400> 16

Ser Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Trp Val
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica para un anticuerpo monoclonal que comprende:
 - 5 a. 200 mg/ml de anticuerpo monoclonal;
 - b. 10 mM de un agente amortiguador de histidina;
 - c. 115 mM de NaCl;
 - d. 25 mM de arginina; y
 - e. 0,01 % (p/v) de polisorbato 80; a pH 6,0; y
- 10 en donde el anticuerpo monoclonal comprende cadenas pesadas y ligeras que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 6 y 7.
2. La formulación farmacéutica según la reivindicación 1, en donde la formulación comprende:
 - 15 a. 200 mg/ml de anticuerpo monoclonal;
 - b. 0,65 mg/ml de L-histidina;
 - c. 1,2 mg/ml de monoclórhidrato de L-histidina
 - d. 6,7 - 7,3 mg/ml de NaCl;
 - 20 e. 5,3 mg/ml de clorhidrato de L-arginina; y
 - f. 0,1 mg/ml de polisorbato 80;
3. La formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es estable al congelarse y descongelarse.
4. La formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para administración subcutánea o intramuscular.
- 30 5. La formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para administración subcutánea.
6. La formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en forma líquida, reconstituida, liofilizada o secada por aspersión.
- 35 7. La formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en forma líquida.
8. Un dispositivo de inyección que comprende la formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 40 9. Un kit que comprende uno o más viales que contienen la formulación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 e instrucciones para la administración subcutánea de la formulación farmacéutica a un paciente.
10. Un kit según la reivindicación 9 y que comprende además un dispositivo de inyección que comprende la formulación farmacéutica.
- 45 11. La formulación farmacéutica, el dispositivo de inyección o el kit según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno susceptible de tratamiento con un anticuerpo anti-BLyS.
- 50 12. La formulación farmacéutica para su uso según la reivindicación 11, en donde la formulación se administra una vez por semana.
13. La formulación farmacéutica, el dispositivo de inyección o el kit para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11-12, en donde la formulación farmacéutica se coadministra de forma concomitante o secuencial con un corticosteroide.
- 55 14. La formulación farmacéutica, el dispositivo de inyección o el kit para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11-13 para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico, vasculitis por anticuerpos contra el citoplasma de neutrófilos (ANCA), nefritis lúpica, síndrome de Sjögren primario, trombocitopenia inmunitaria crónica, miastenia grave, macroglobulinemia de Waldenström sintomática, desensibilización inmunitaria de pacientes que esperan un trasplante de riñón, nefropatía membranosa, esclerosis sistémica, artritis reumatoide, mieloma múltiple, esclerosis múltiple e insuficiencia renal.
- 60 15. La formulación farmacéutica, el dispositivo de inyección o el kit para su uso según una cualquiera de las

reivindicaciones 11-14 para su uso en el tratamiento de lupus eritematoso sistémico.

16. La formulación farmacéutica, el dispositivo de inyección o el kit para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11-14 para su uso en el tratamiento del síndrome de Sjögren.

ES 2 927 990 T3

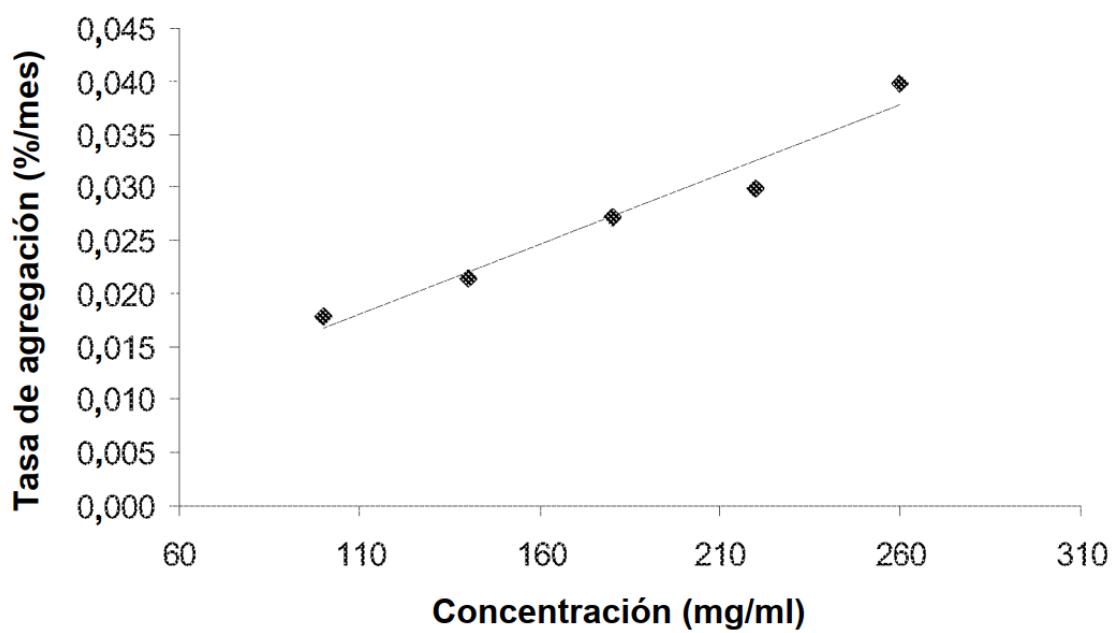


Figura 1

ES 2 927 990 T3

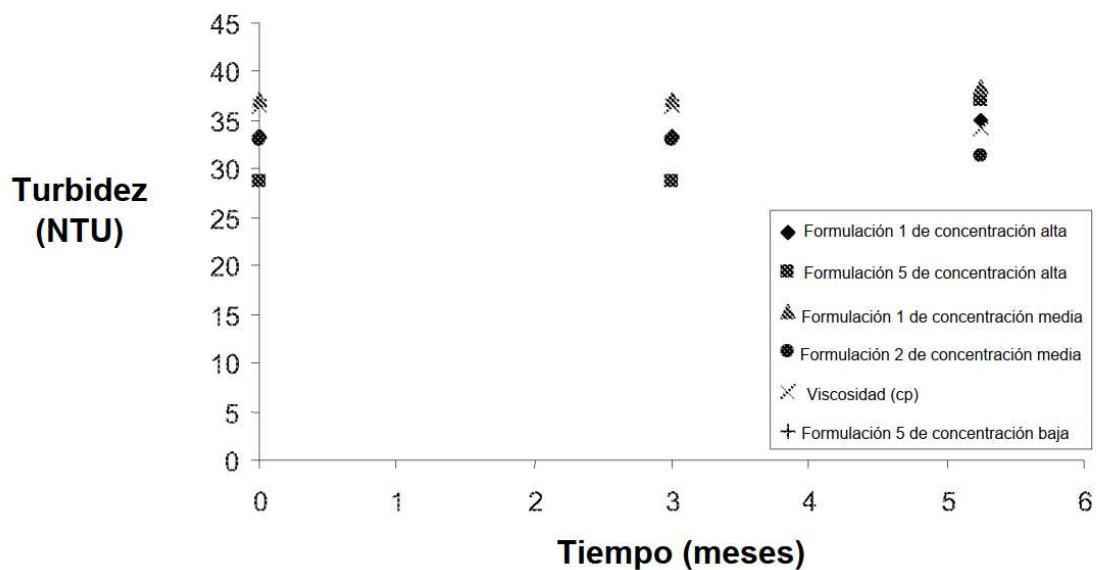


Figura 2

ES 2 927 990 T3

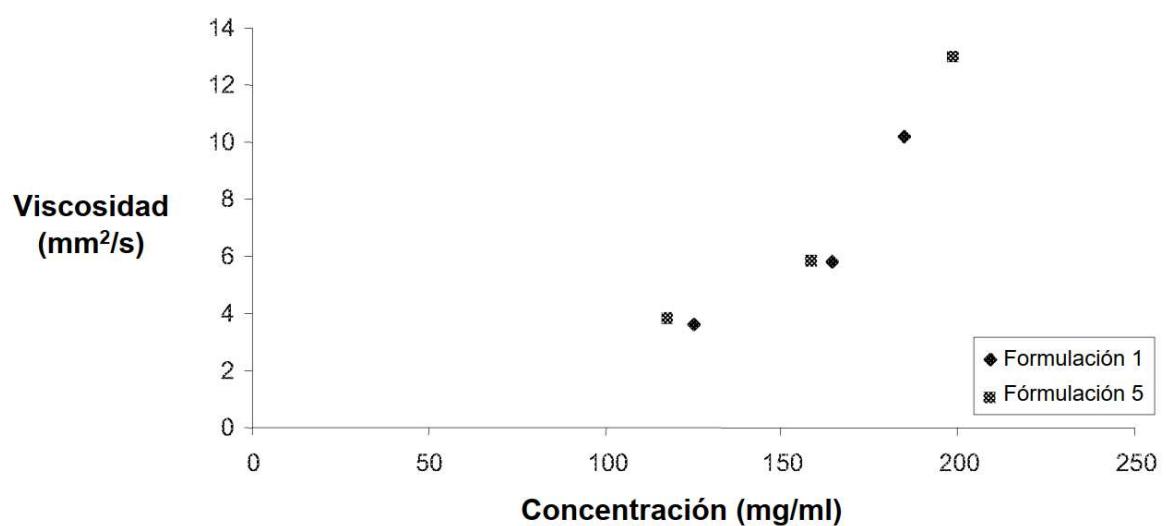


Figura 3

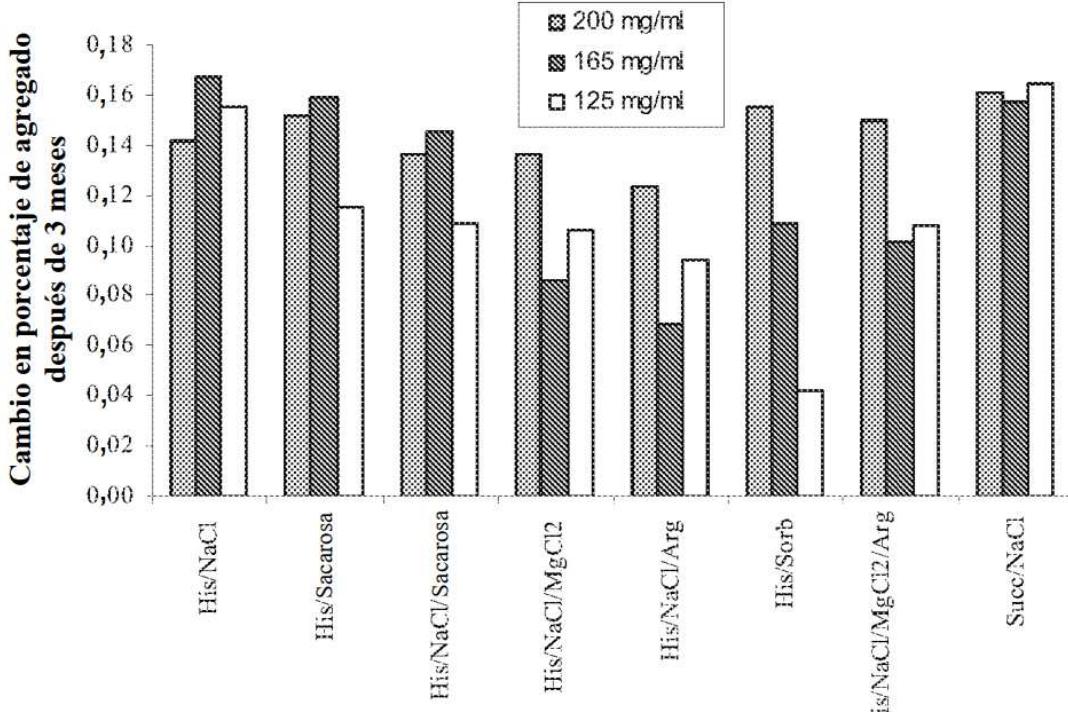


Figura 4

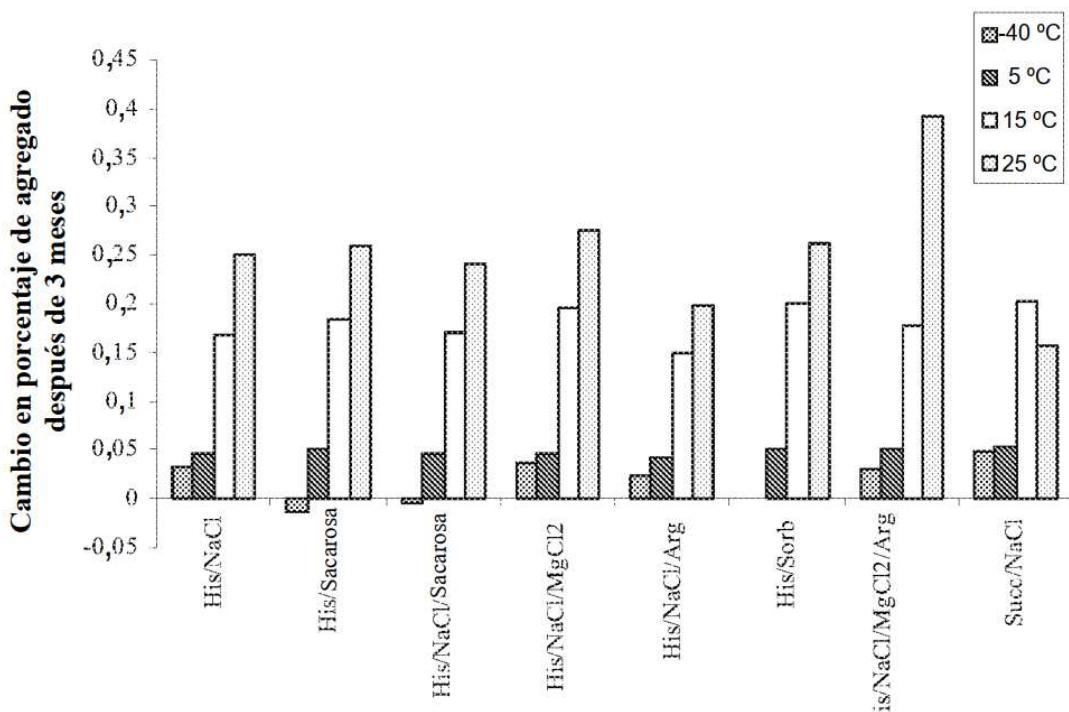


Figura 5

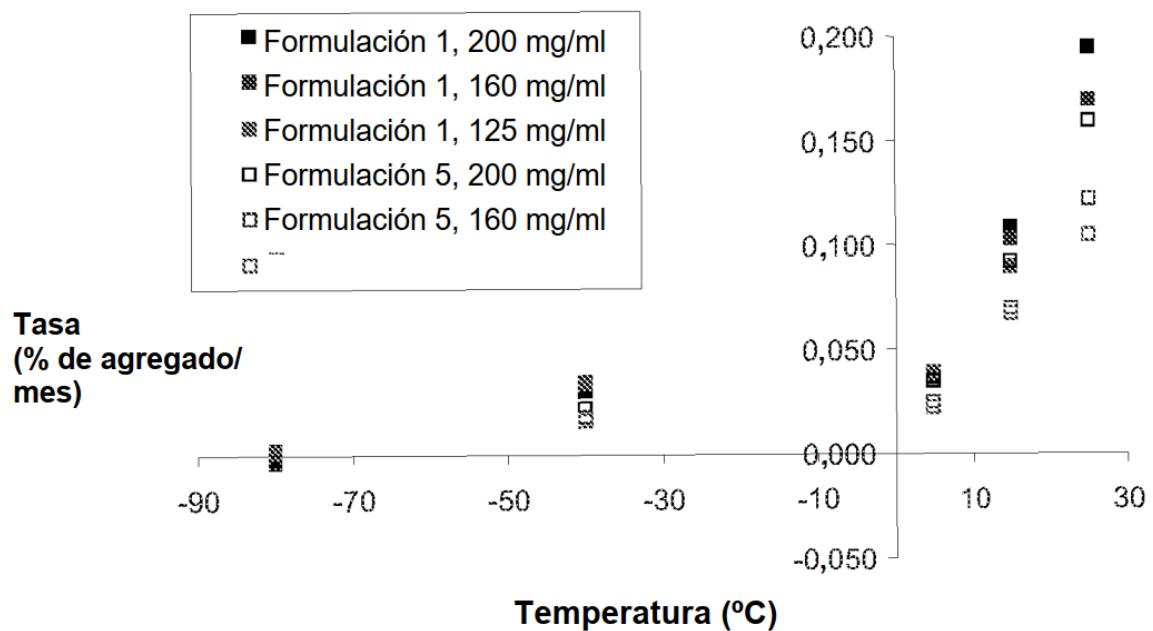


Figura 6

ES 2 927 990 T3

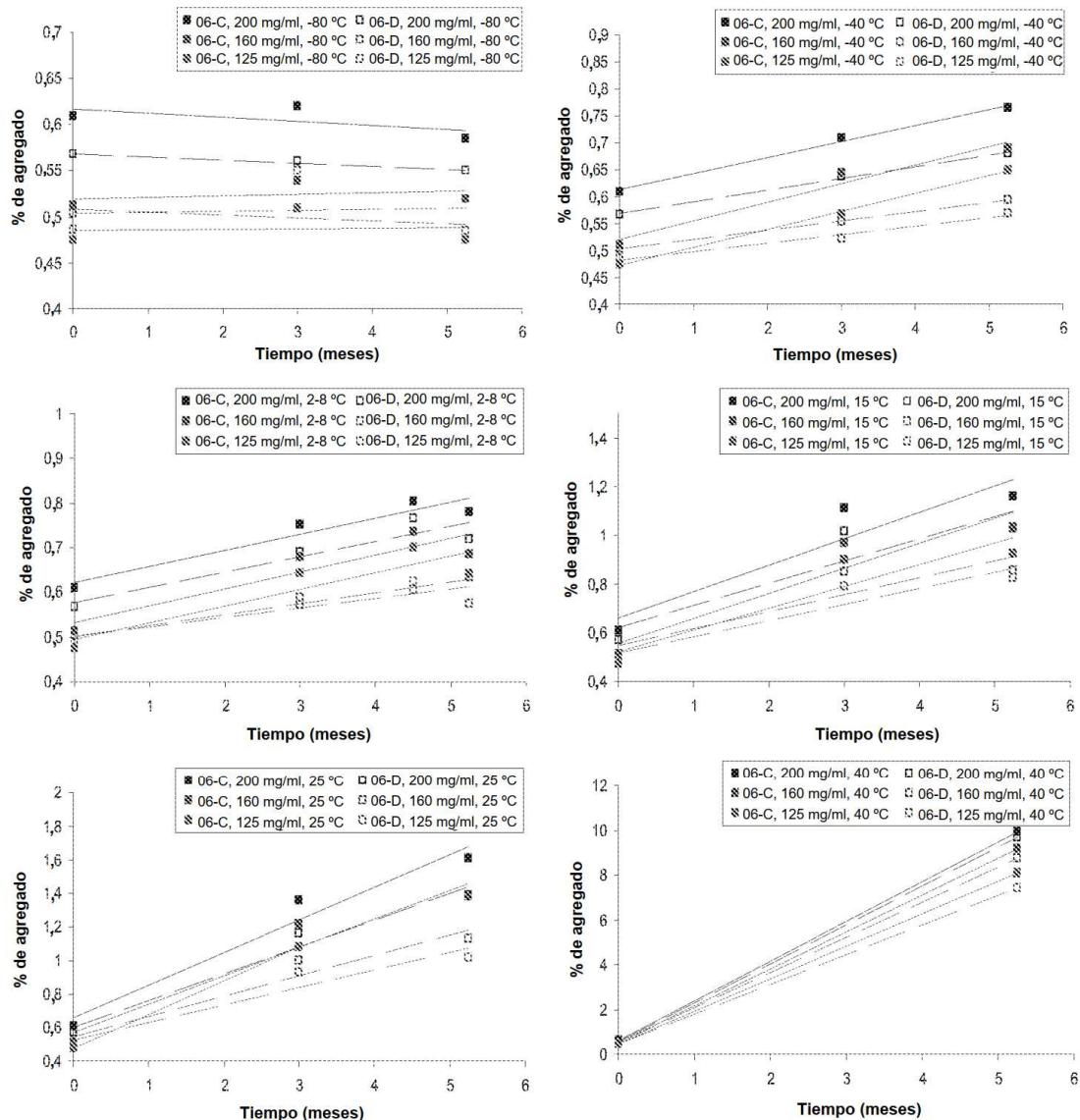


Figura 7

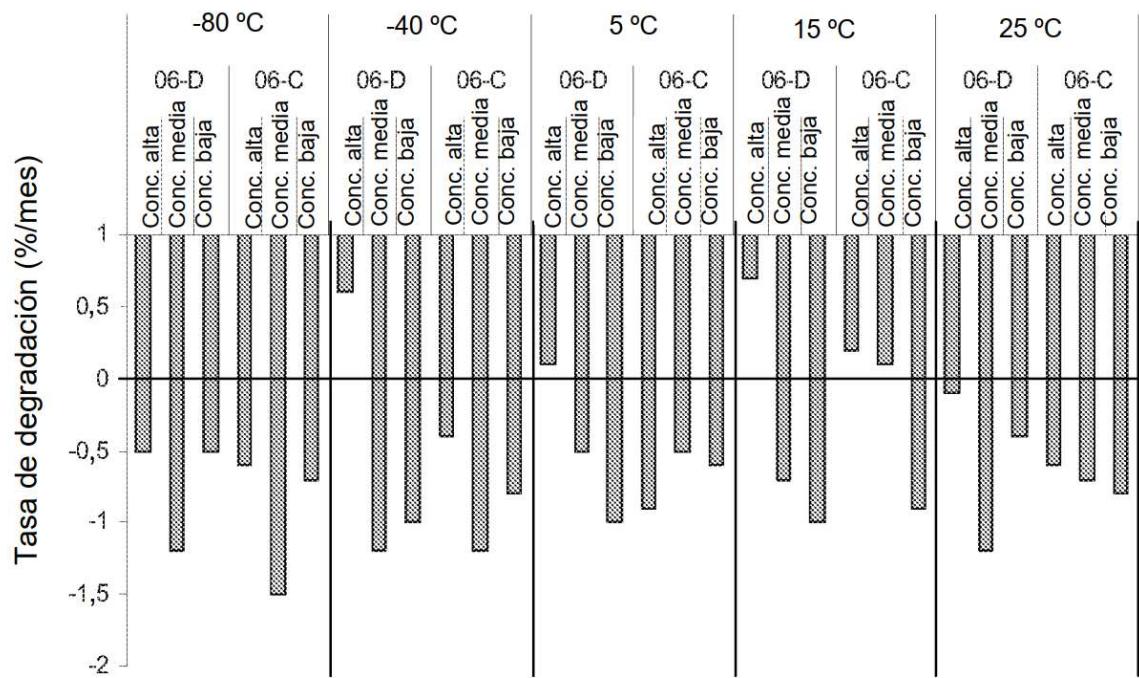


Figura 8

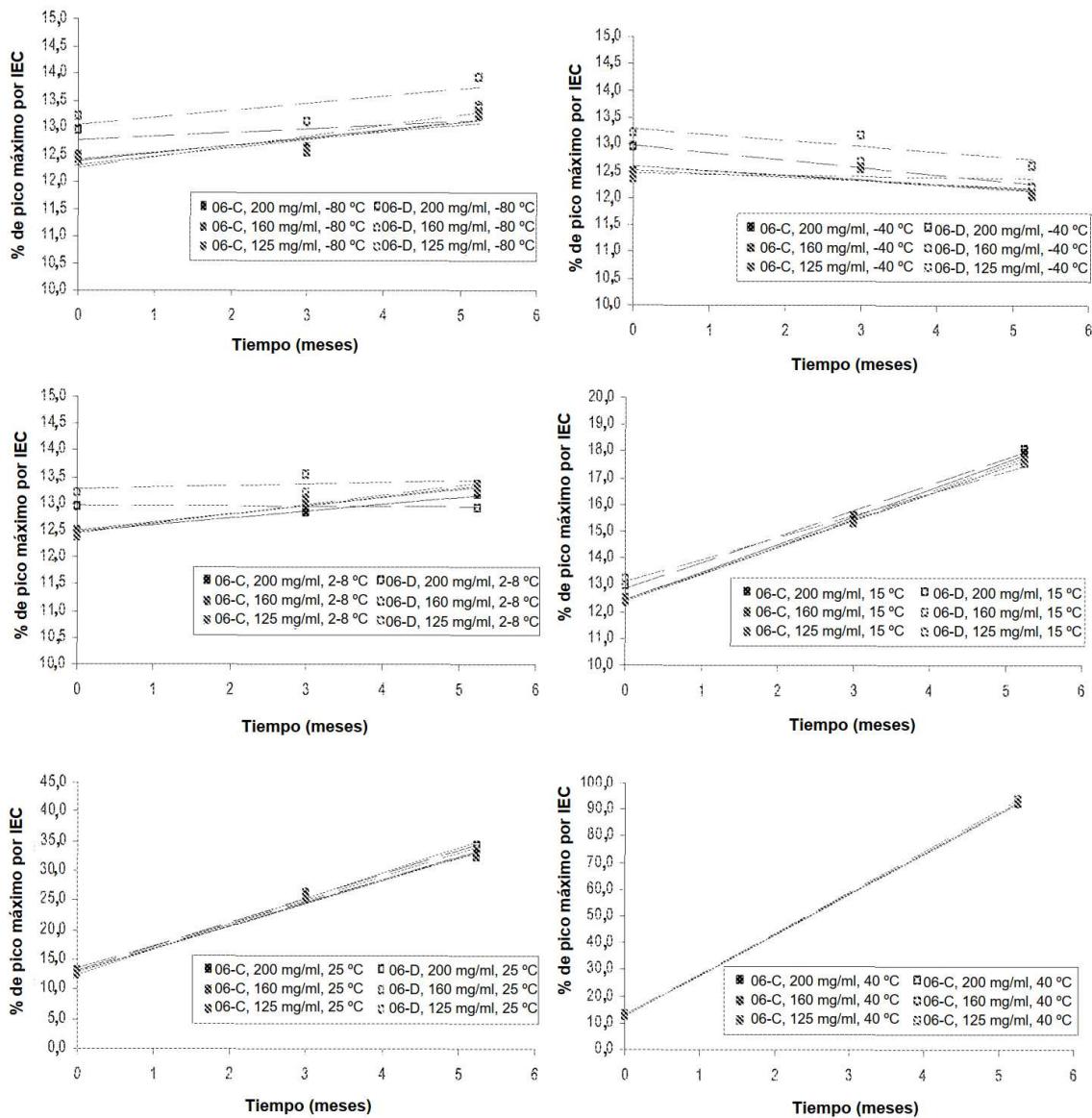


Figura 9

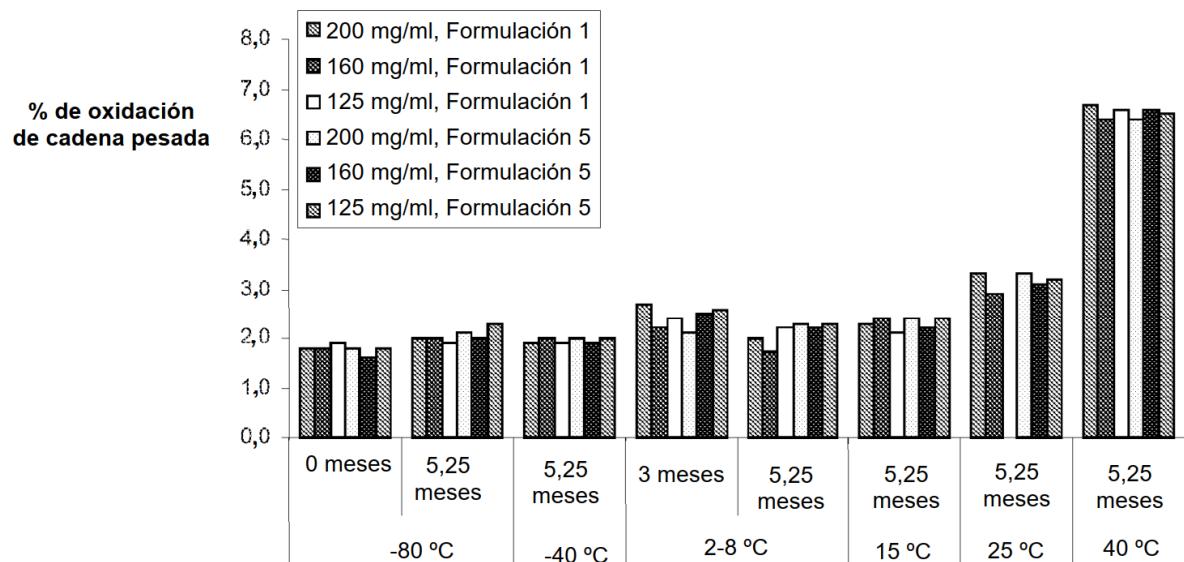


Figura 10

ES 2 927 990 T3

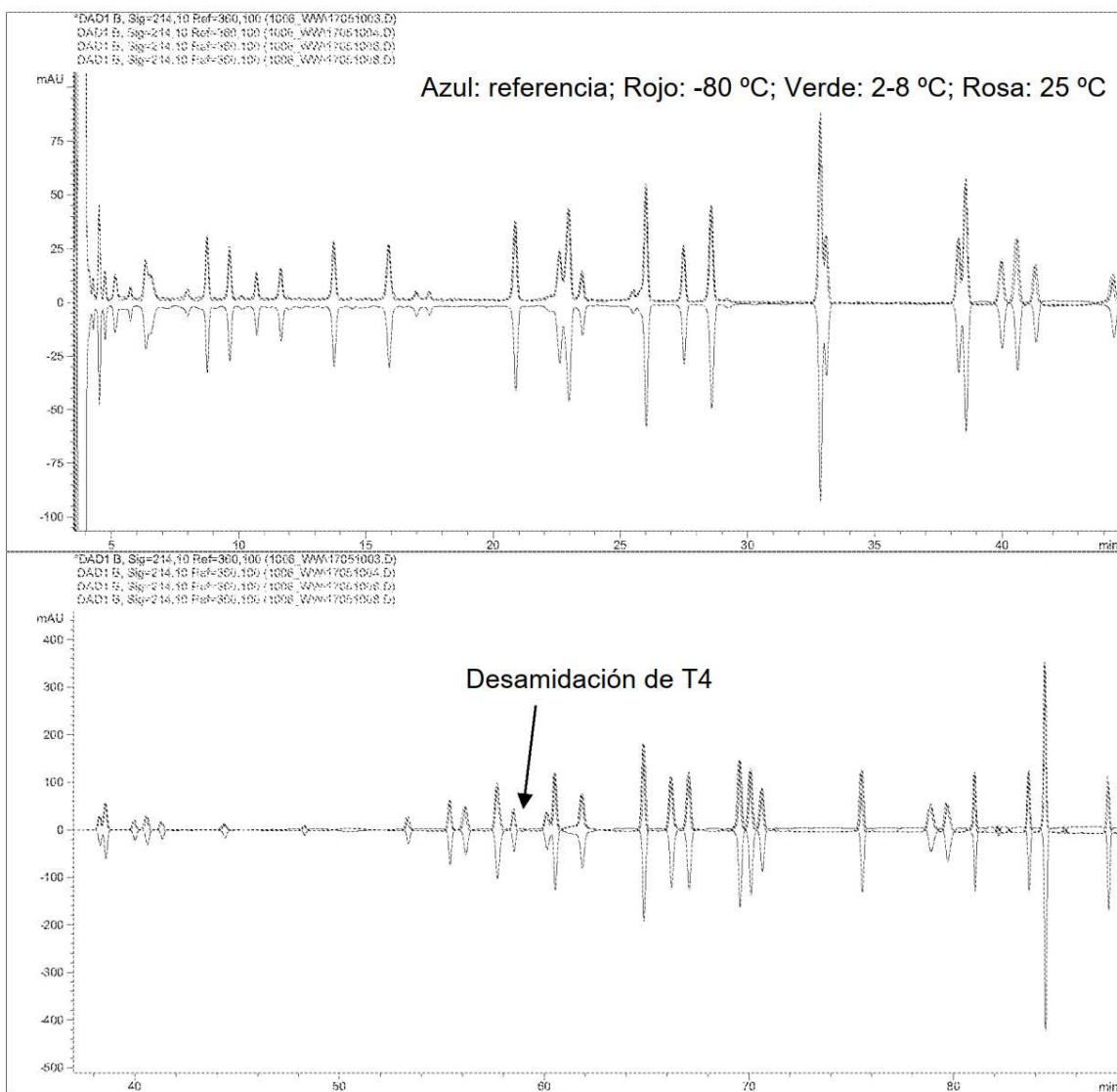


Figura 11

ES 2 927 990 T3

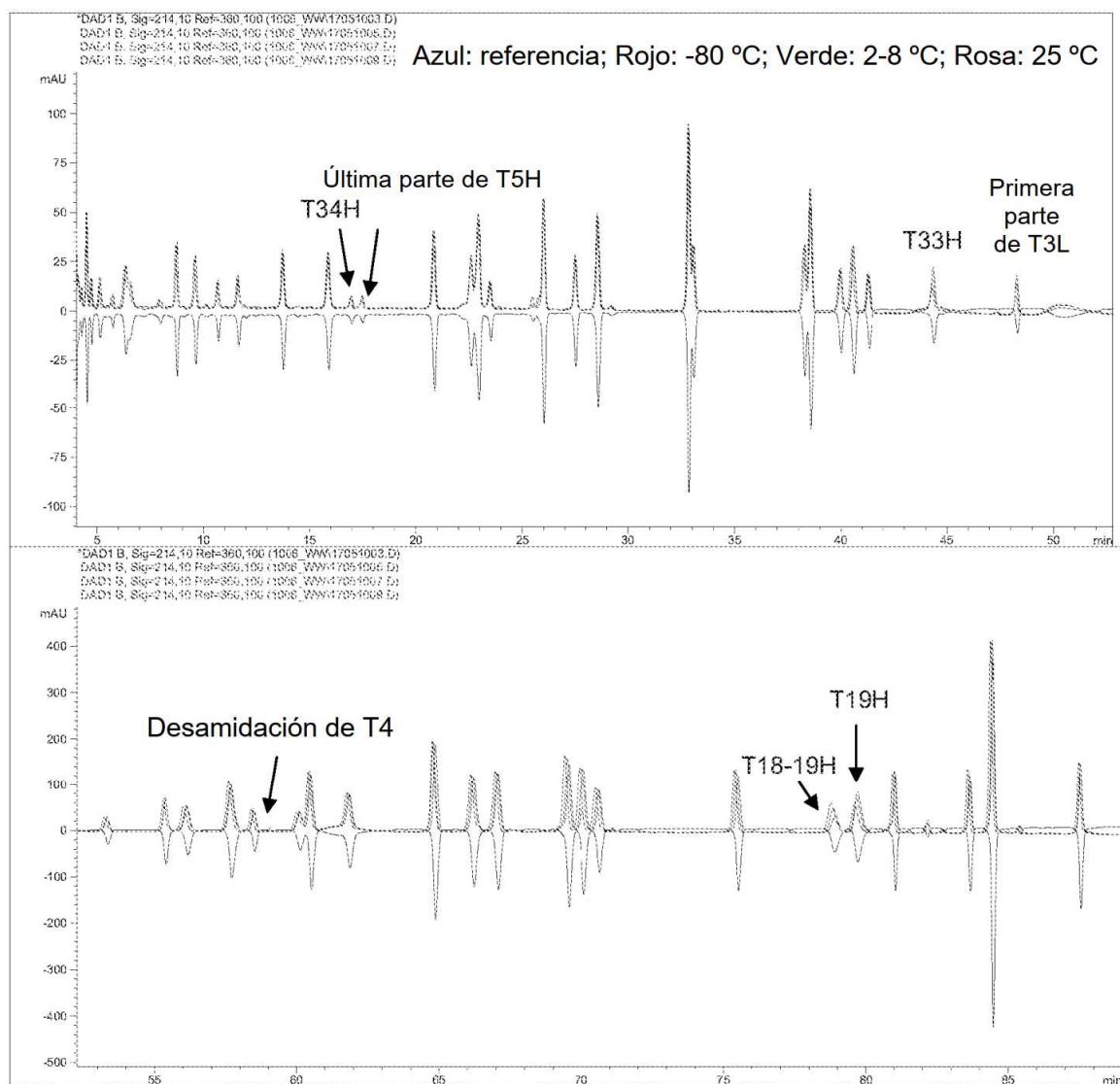


Figura 12

ES 2 927 990 T3

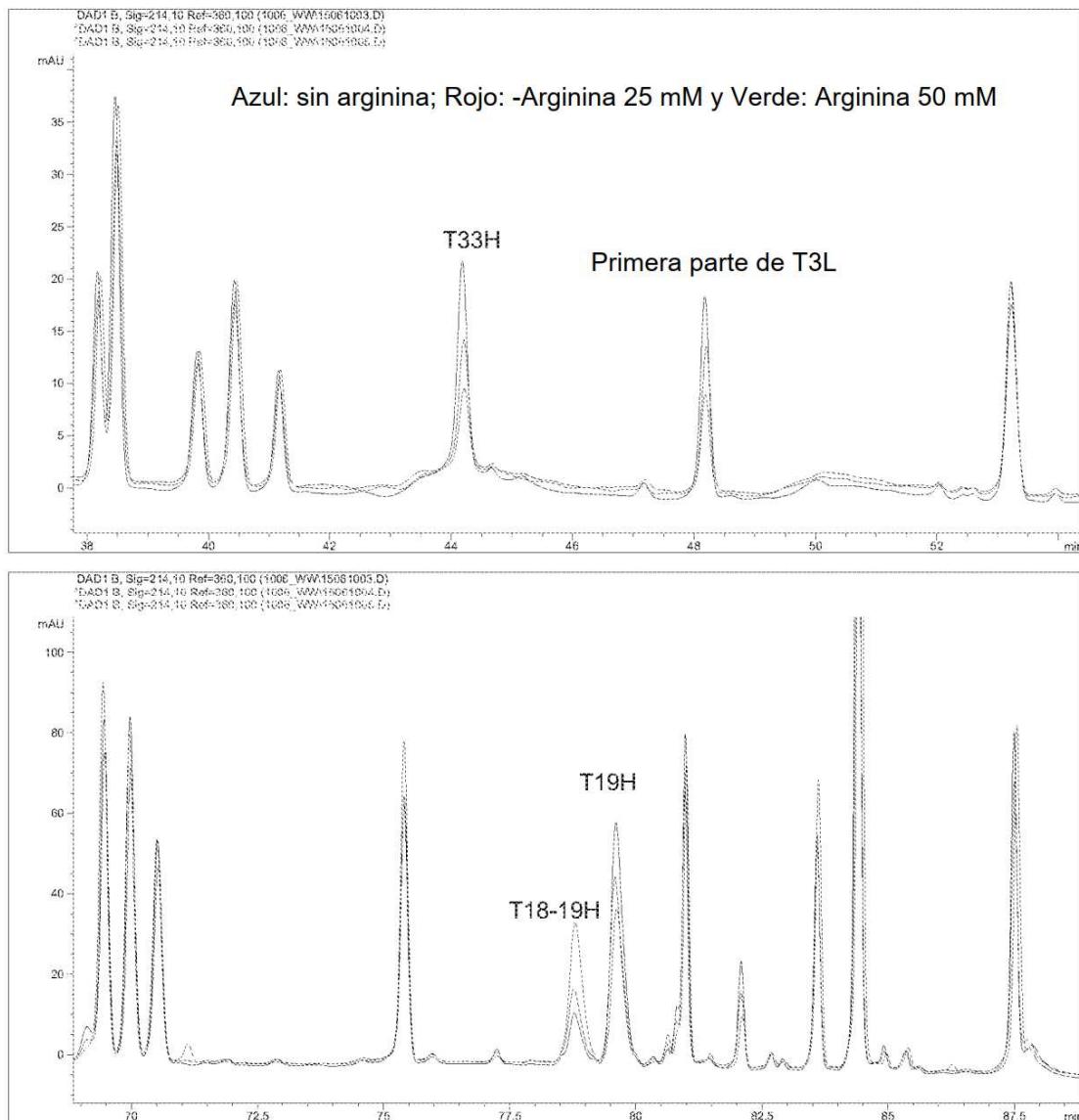


Figura 13

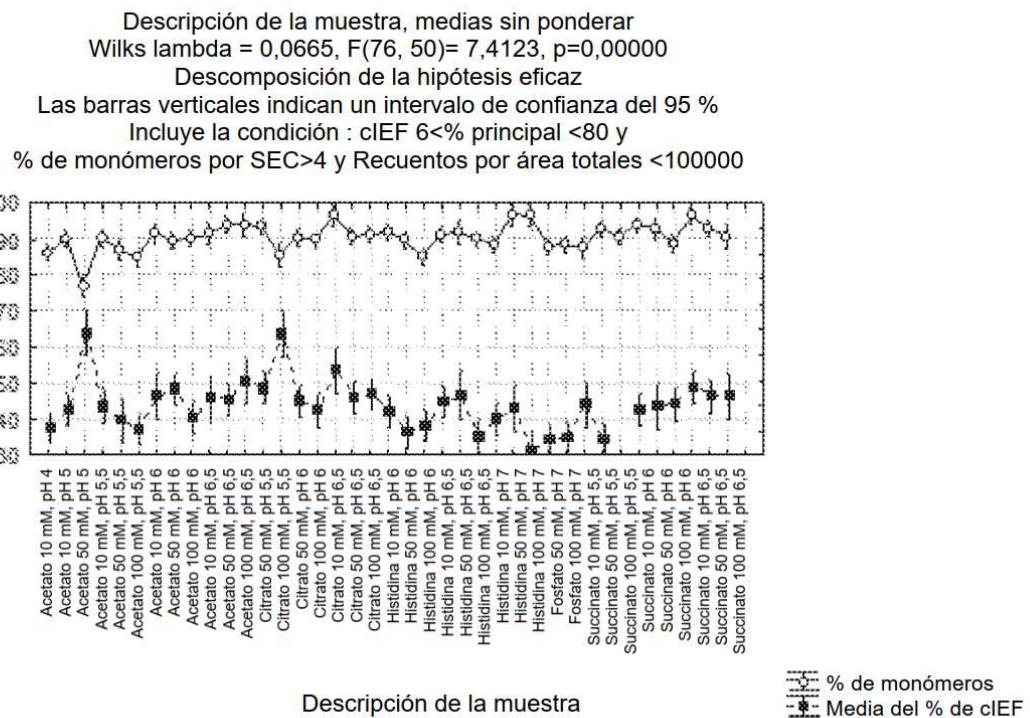


Figura 14

Programa Design Expert®

Monómero por SEC

● Puntos de diseño

■ B1 Acetato

▲ B2 Succinato

◆ B3 Histidina

X1 = A: pH

X2 = B: amortiguador

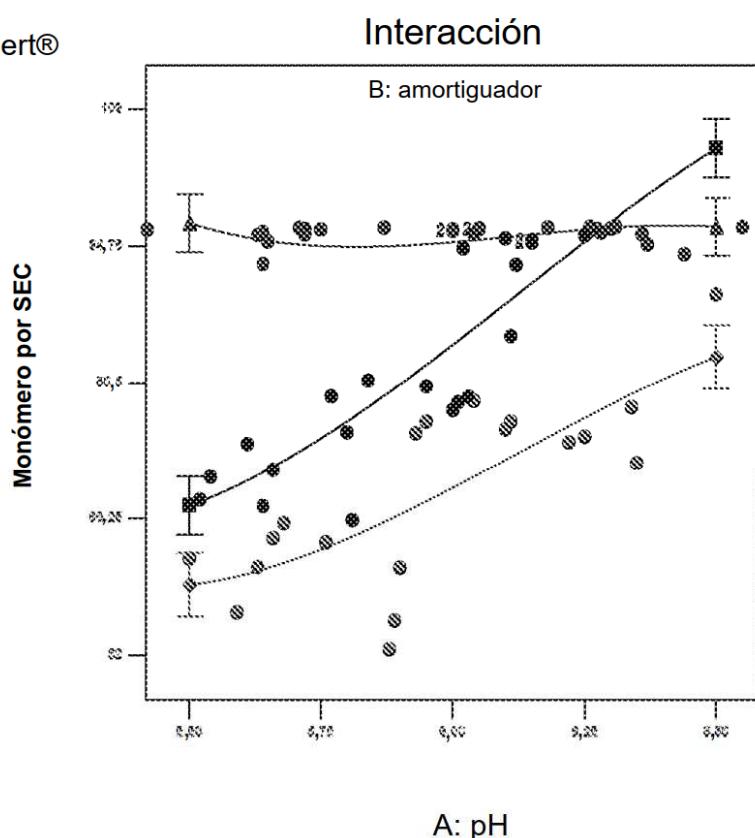


Figura 15

Programa Design Expert®

Monómero por SEC

* Puntos de diseño

■ B1 Acetato
▲ B2 Succinato
◆ B3 Histidina

X1 = A: pH

X2 = B: amortiguador

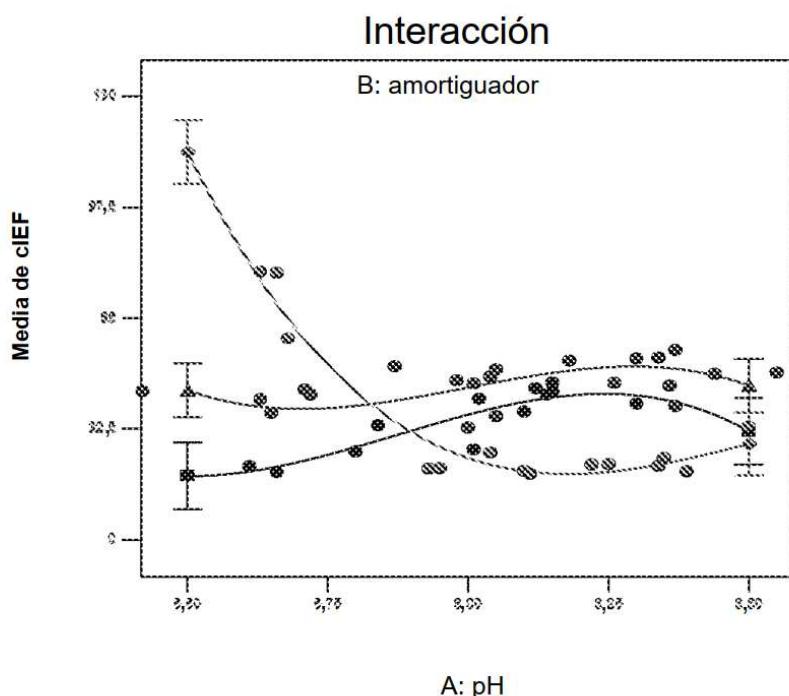


Figura 16

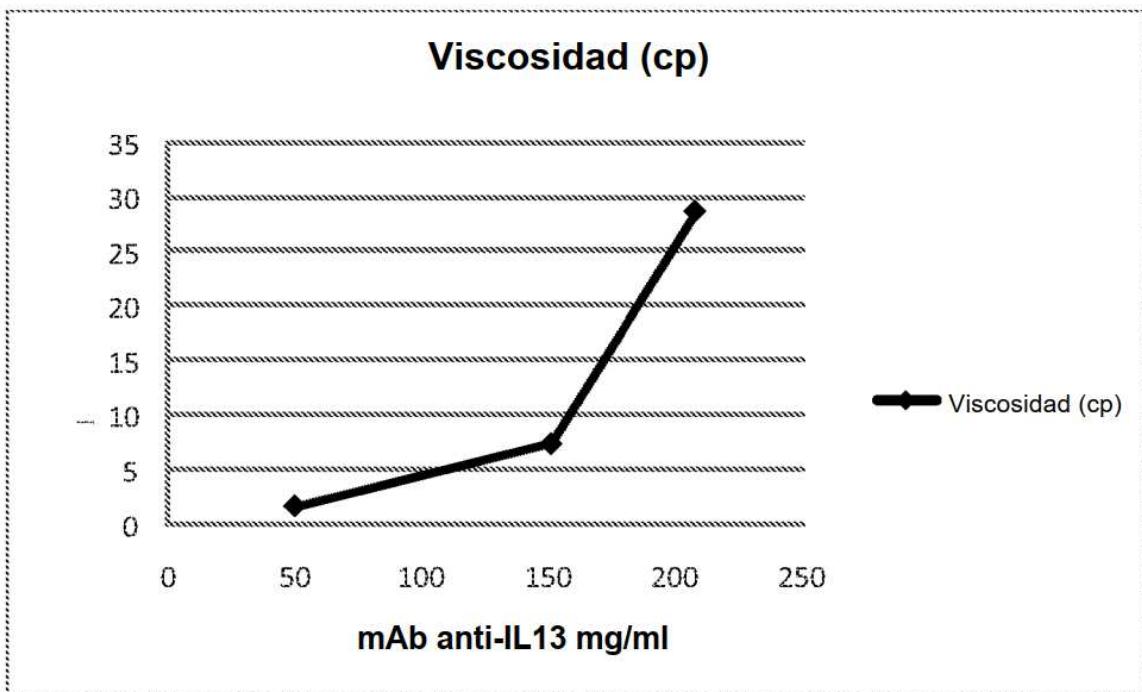


Figura 17

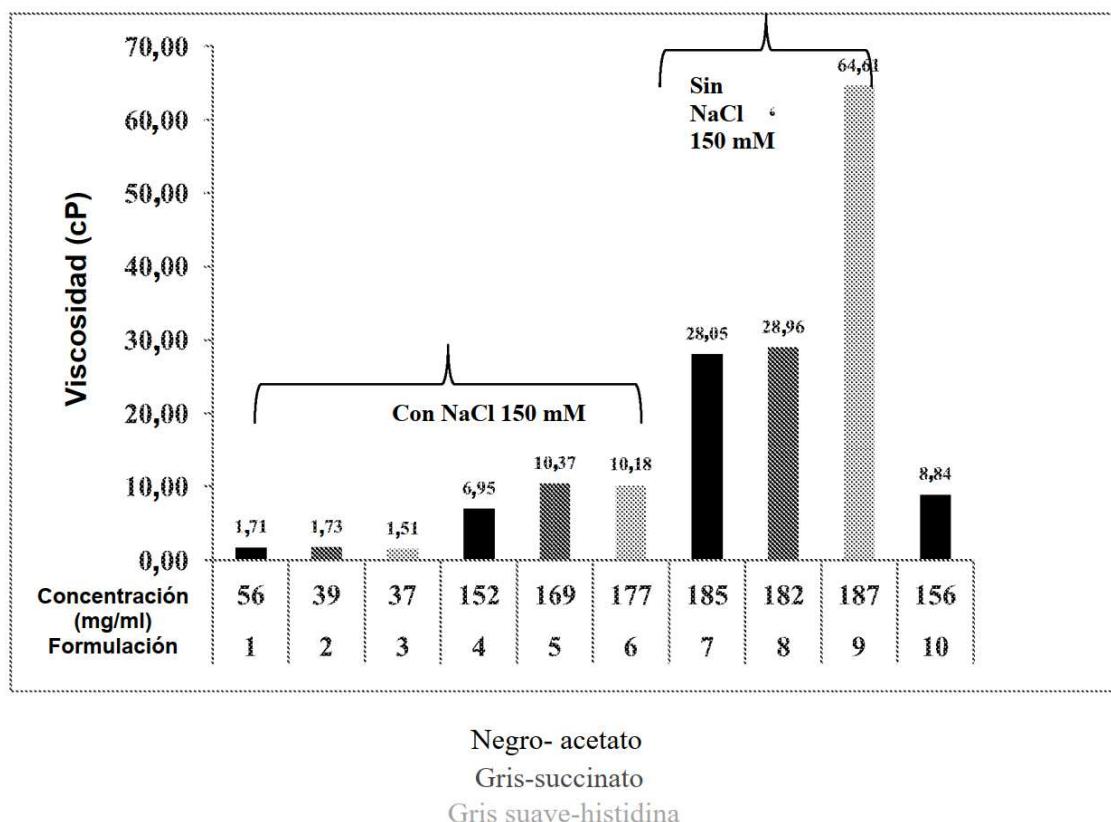


Figura 18

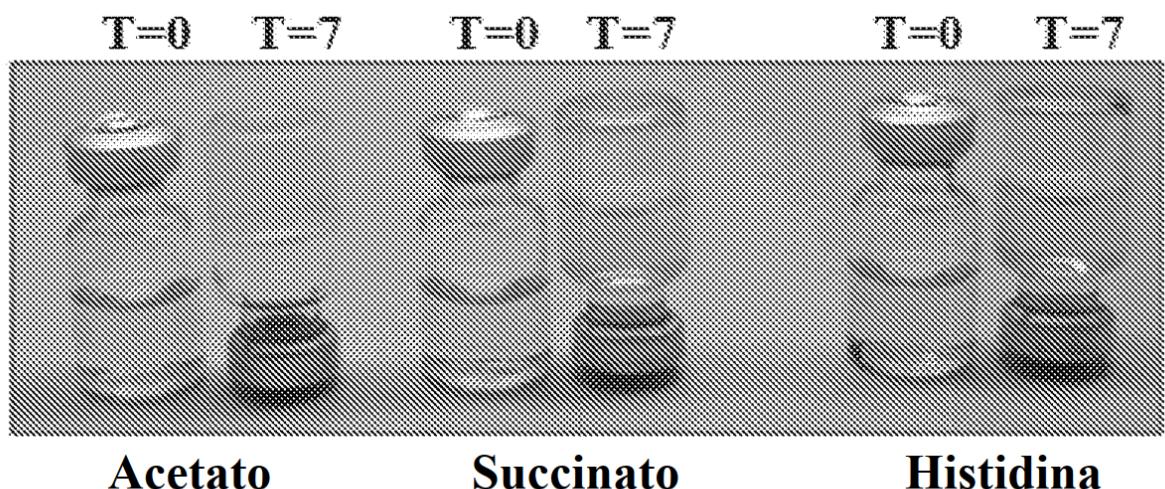


Figura 19

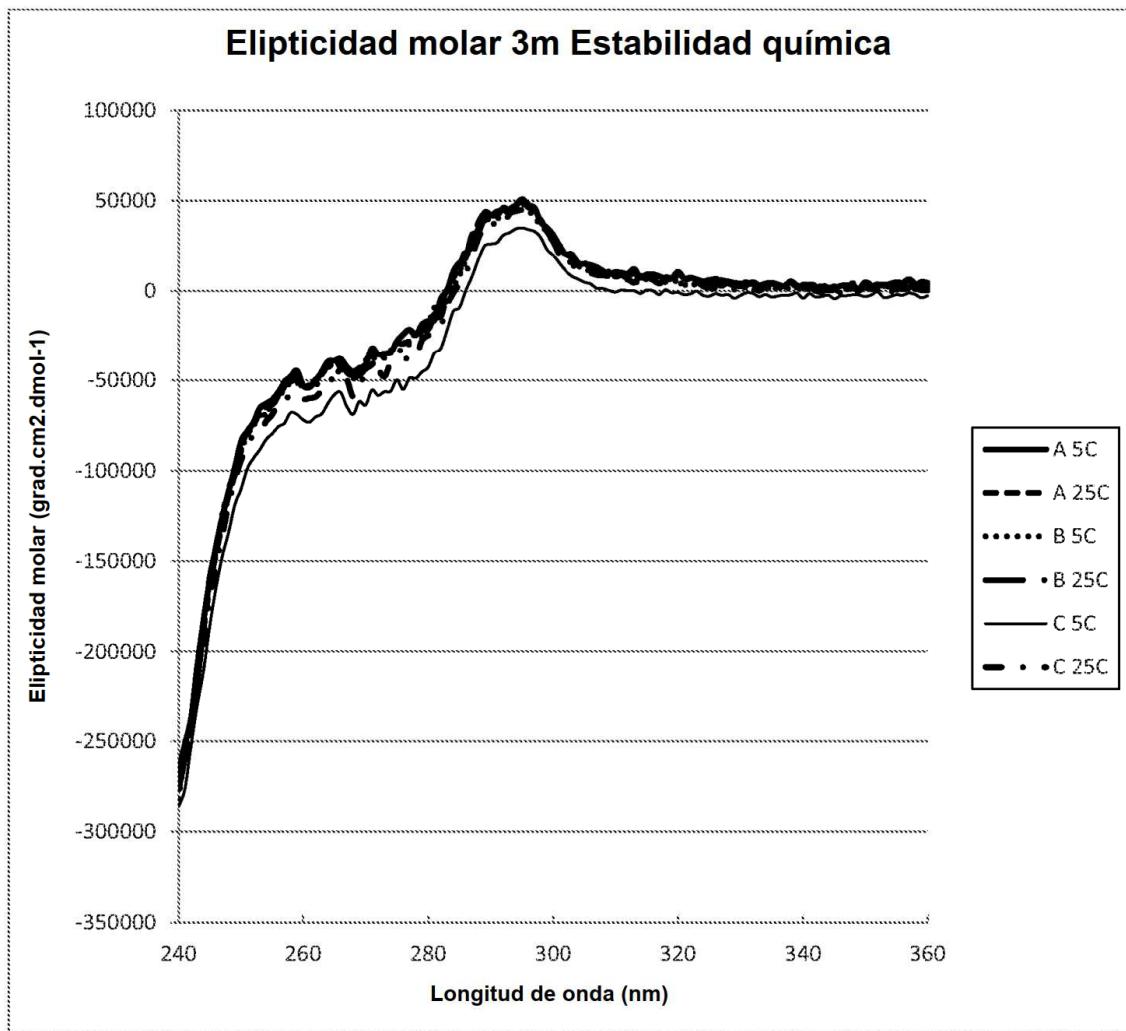


Figura 20