

TÍTULO

[0001] POLIPÉPTIDOS RECEPTORES FORMULADOS Y MÉTODOS RELACIONADOS

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

[0002] Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisoria U. S. N.º 61/012.104, presentada el 13 de junio de 2014, de la solicitud provisoria U. S. N.º 62/047.995, presentada el 9 de septiembre de 2014, de la solicitud provisoria U. S. N.º 62/058.789, presentada el 2 de octubre de 2014 y de la solicitud provisoria U. S. N.º 62/142.812, presentada el 3 de abril de 2015; la divulgación completa de cada una de éstas se incorpora de este modo en la presente por referencia, en su totalidad, para todo propósito.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0003] La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que ha sido presentado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora de este modo por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 10 de junio de 2015, se denomina 29502PCT_CRF_sequencelisting.txt y tiene un tamaño de 83.907 bytes.

ANTECEDENTES

[0004] La familia de proteínas del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) incluye los factores de crecimiento transformante β (TGF- β), las activinas, las proteínas morfogénicas óseas (BMP), los factores de crecimiento nervioso (NGFs), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y los factores de crecimiento y diferenciación (GDFs). Estos miembros de la familia están involucrados en la regulación de un amplio rango de procesos biológicos incluyendo la proliferación celular, la diferenciación y otras funciones.

[0005] El factor de crecimiento y diferenciación 8 (GDF-8), denominado también miostatina, es un miembro de la familia TGF- β expresado en su mayor parte en las células del tejido muscular esquelético adulto y en desarrollo. La miostatina parece tener un rol esencial en el control negativo del crecimiento del músculo esquelético (McPherron et al., Nature (Londres) 387, 83–90 (1997), Zimmers et al., Science 296:1486–1488 (2002)). Se ha demostrado que la antagonización de la miostatina aumenta la masa muscular magra en animales.

[0006] Otro miembro de la familia de proteínas de TGF- β es un factor de crecimiento y diferenciación relacionado, el factor de crecimiento y diferenciación 11 (GDF-11). El GDF-11 tiene aproximadamente 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la

miostatina. El GDF–11 tiene un rol en el patrón axial en animales en desarrollo (Oh et al., Genes Dev 11:1812–26 (1997)), y también parece tener un rol en el crecimiento y el desarrollo del músculo esquelético.

[0007] Las activinas A, B y AB son los homodímeros y heterodímero, respectivamente de dos cadenas de polipéptidos, βA y βB (Vale et al., Nature 321, 776–779 (1986), Ling et al., Nature 321, 779–782 (1986)). Las activinas fueron descubiertas originalmente como péptidos gonadales involucradas en la regulación de la síntesis de la hormona folículo–estimulante, y se cree ahora que están involucradas en la regulación de una cantidad de actividades biológicas. La activina A es una forma predominante de activina.

[0008] La activina, la miostatina, el GDF–11 y otros miembros de la superfamilia de TGF– β ligan y señalizan a través de una combinación de receptores de activina tipo II y activina tipo IIB, los cuales son serina/treonina quinasas transmembrana (Harrison et al., J. Biol. Chem. 279, 28036–28044 (2004)). Estudios cruzados han determinado que la miostatina es capaz de ligar los receptores de la activina tipo II ActRIIA y ActRIIB *in vitro* (Lee et al., PNAS USA 98:9306–11 (2001)). También hay evidencia de que el GDF–11 se liga a ambos, ActRIIA y ActRIIB (Oh et al., Genes Dev 16:2749–54 (2002)).

[0009] Se sabe que la expresión de la proteína TGF– β está asociada con una variedad de enfermedades y trastornos. Por lo tanto, las moléculas terapéuticas capaces de antagonizar a varias proteínas TGF– β simultáneamente pueden particularmente efectivas para el tratamiento de estas enfermedades y trastornos.

[0010] Las solicitudes relacionadas incluyen: la U.S. serie N.º 12/626.375, presentada el 25 de noviembre de 2009, la U.S. serie N.º 12/074.877, presentada el 5 de marzo de 2008, la U.S. serie N.º 13/329.897, presentada el 19 de diciembre de 2011, la U.S. serie N.º 11/590.962, presentada el 31 de octubre de 2006, la PCT/US2014/014490, presentada el 3 de febrero de 2014, y la PCT/US2015/011396, presentada el 14 de enero de 2015; cada una de las cuales se incorpora de este modo por referencia, en su totalidad, para todo propósito.

SÍNTESIS

[0011] Se divulga en la presente una composición que comprende una solución de una proteína, un excipiente, un tampón, y un tensioactivo, donde la composición comprende un pH de 4–12, donde la proteína comprende un polipéptido capaz de ligar al menos uno de miostatina, activina o GDF–11, opcionalmente donde el polipéptido es seleccionado del grupo que consiste en: (a) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos presentada en el grupo que consiste en la

SEQ ID NO: 4, 6, 12, y 14; (b) un polipéptido que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con (a), y el polipéptido tiene un W o un Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la secuencia presentada en la SEQ ID NO:2 y un T en la posición correspondiente a la posición 44 de la secuencia presentada en la SEQ ID NO:2, (c) un polipéptido que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con (a), donde el polipéptido tiene un W o un Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la secuencia presentada en la SEQ ID NO:2 y un T en la posición correspondiente a la posición 44 de la secuencia presentada en la SEQ ID NO:2, y (d) un polipéptido que tiene una secuencia con al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia presentada en los aminoácidos 19–25, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 a 130–134, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 ó 134 de la SEQ ID NO: 2; y donde la proteína en la composición retiene al menos 80% de estabilidad durante un período de tiempo de más de 1 mes en solución cuando se mantiene a 2–8 °C o 5 °C con relación a la proteína en la composición al comienzo del período de tiempo (0 meses) o con relación a una proteína idéntica mantenida bajo condiciones de otro modo idénticas durante más de 1 mes a –20 °C o –70 °C; y, opcionalmente donde la composición comprende además un agente quimioterapéutico o un segundo agente terapéutico.

[0012] También se divulga en la presente un método para inhibir un crecimiento de un tumor sólido en un sujeto o para tratar un tumor sólido en un sujeto, que comprende la administración de una dosis fija que oscila entre al menos 0,1 mg/kg y 20 mg/kg de una proteína al sujeto, donde la proteína comprende un polipéptido capaz de ligar al menos uno de miostatina, activina o GDF–11, opcionalmente donde el polipéptido es seleccionado entre el grupo que consiste en: (a) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos presentada en el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, 6, 12, y 14; (b) un polipéptido que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con (a), y el polipéptido tiene un W o un Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la secuencia presentada en la SEQ ID NO:2 y un T en la posición correspondiente a la posición 44 de la secuencia presentada en la SEQ ID NO:2, (c) un polipéptido que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con (a), donde el polipéptido tiene un W o un Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la secuencia presentada en la SEQ ID NO:2 y un T en la posición correspondiente a la posición 44 de la secuencia presentada en la SEQ ID NO:2, y (d) un polipéptido que tiene una secuencia con al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia presentada en los aminoácidos 19–25, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 a 130–134, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 ó 134 de la SEQ ID NO: 2.

[0013] También se divulga en la presente un método que inhibe, reduce o trata la caquexia en un sujeto, que comprende administrar una dosis fija que oscila entre al menos 0,1 mg/kg y 20 mg/kg de una proteína al sujeto, donde la proteína comprende un polipéptido capaz de ligar al menos uno de miostatina, activina o GDF–11, opcionalmente donde el polipéptido es seleccionado entre el grupo que consiste en: (a) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos presentada en el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, 6, 12, y 14; (b) un polipéptido que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con (a), y el polipéptido tiene un W o un Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la secuencia presentada en la SEQ ID NO:2 y un T en la posición correspondiente a la posición 44 de la secuencia presentada en la SEQ ID NO:2, (c) un polipéptido que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con (a), donde el polipéptido tiene un W o un Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la secuencia presentada en la SEQ ID NO:2 y un T en la posición correspondiente a la posición 44 de la secuencia presentada en la SEQ ID NO:2, y (d) un polipéptido que tiene una secuencia con al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia presentada en los aminoácidos 19–25, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 a 130–134, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 ó 134 de la SEQ ID NO: 2.

[0014] También se divulga en la presente un método para el tratamiento de la obesidad o una enfermedad asociada con la obesidad, para aumentar o mantener la masa muscular, o para reducir la masa grasa en un sujeto, que comprende: administrar al sujeto una dosis efectiva de una proteína que inhibe al menos uno de activina, miostatina y GDF–11, opcionalmente donde la enfermedad asociada con la obesidad es al menos una de un síndrome de obesidad genética, síndrome de Prader Willi, un trastorno hipotalámico, hipercolesterolemia familiar, síndrome de Bardet–Biedl, síndrome de Prader–Willi, un síndrome resultante de una pérdida de genes improntados en 15q11–13, síndrome de Alstrom, síndrome de Cohen, osteodistrofia hereditaria de Albright (pseudohipoparatiroidismo), síndrome de Carpenter, síndrome de MOMO, síndrome de Rubinstein–Taybi, un síndrome resultante de las deleciones de al menos uno de 6q16, 1p36, 2q37, y 9q34, disomía uniparental materna del cromosoma 14, síndrome del X frágil, aterosclerosis, esteatohepatitis no alcohólica, una enfermedad en la que la deposición de grasa visceral da por resultado uno o más desenlaces deletéreos, enfermedad cerebrovascular, hígado graso y síndrome de Börjeson–Forssman–Lehman, y opcionalmente donde el polipéptido es seleccionado del grupo que consiste en: (a) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos presentada en el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, 6, 12, y 14; (b) un polipéptido que tiene al menos 90% de

identidad de secuencia con (a), y el polipéptido tiene un W o un Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la secuencia presentada en la SEQ ID NO:2 y un T en la posición correspondiente a la posición 44 de la secuencia presentada en la SEQ ID NO:2, (c) un polipéptido que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con (a), donde el polipéptido tiene un W o un Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la secuencia presentada en la SEQ ID NO:2 y un T en la posición correspondiente a la posición 44 de la secuencia presentada en la SEQ ID NO:2, y (d) un polipéptido que tiene una secuencia con al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia presentada en los aminoácidos 19–25, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 a 130–134, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 ó 134 de SEQ ID NO: 2.

[0015] También se divulga en la presente un método para producir una proteína que comprende un polipéptido capaz de ligar al menos uno de miostatina, activina, o GDF–11, opcionalmente donde el polipéptido es seleccionado del grupo que consiste en: (a) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos presentada en el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, 6, 12, y 14; (b) un polipéptido que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con (a), y el polipéptido tiene un W o un Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la secuencia presentada en la SEQ ID NO:2 y un T en la posición correspondiente a la posición 44 de la secuencia presentada en la SEQ ID NO:2, (c) un polipéptido que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con (a), donde el polipéptido tiene un W o un Y en la posición correspondiente a la posición 28 de la secuencia presentada en la SEQ ID NO:2 y un T en la posición correspondiente a la posición 44 de la secuencia presentada en la SEQ ID NO:2, y (d) un polipéptido que tiene una secuencia con al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia presentada en los aminoácidos 19–25, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 a 130–134, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 ó 134 de la SEQ ID NO: 2, donde el método comprende: cultivar una línea celular de ovario de hámster chino CS9 modificada por ingeniería genética para expresar la proteína en un cultivo celular; cosechar la proteína del cultivo; y purificar la proteína.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS DIVERSAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

[0016] Éstas y otras características, aspectos y ventajas se comprenderán mejor más adelante con relación a la siguiente descripción y los dibujos adjuntos, donde:

[0017] La Figura 1 muestra un panorama del proceso de cultivo celular para preparar el STM 434.

[0018] La Figura 2 muestra un panorama del proceso de purificación para el STM 434.

[0019] La Figura 3 muestra un diagrama de flujo para preparar y envasar el STM 434.

[0020] La Figura 4 muestra que los niveles de FSH disminuyeron en 2 de 3 sujetos después de la administración de STM 434 dosificado a 0,25 mg/kg.

[0021] La Figura 5 muestra un análisis PK intermedio para STM 434 en humanos.

[0022] La Figura 6 muestra la exploración de línea de base con el tumor indicado en el círculo.

[0023] La Figura 7 muestra la exploración de seguimiento tomada al comienzo del ciclo 4, con el tumor indicado nuevamente en el círculo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Composiciones

[0024] Se describe en la presente una proteína aislada que comprende un polipéptido receptor de activina IIB humana estabilizada (svActRIIB) y formulaciones relacionadas. Las proteínas y los polipéptidos pueden ser caracterizados por su capacidad para ligarse a al menos una de tres proteínas de TGF- β , miostatina (GDF-8), activina A o GDF-11, para inhibir las actividades de al menos una de estas proteínas, y, opcionalmente, para tener propiedades de elaboración mejoradas en comparación con otros receptores solubles de ActRIIB. El polipéptido receptor de activina IIB humano estabilizado puede ser caracterizado por sustituciones de aminoácidos en ambas posiciones, E28 y S44, con referencia al dominio extracelular de ActRIIB, como se presenta en la SEQ ID NO: 2. En una forma de realización, un polipéptido receptor de activina IIB humano estabilizado puede tener una sustitución adicional de alanina en la posición 64 con respecto a la SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos, una proteína es un anticuerpo, una proteína a base de ActRIIB y/o una proteína de fusión Fc. En algunos aspectos, una proteína de fusión Fc es una proteína de fusión Fc ActRIIB. En algunos aspectos, una proteína ActRIIB comprende una secuencia con al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia presentada en los aminoácidos 19–25, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 a 130–134, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 ó 134 de la SEQ ID NO: 2, opcionalmente donde la Fc es IgG, opcionalmente donde la IgG es IgG humana. En algunos aspectos, una proteína ActRIIB comprende o consiste en la secuencia presentada en la SEQ ID NO:6 o la SEQ ID NO:10. En algunos aspectos, una proteína ActRIIB comprende una secuencia con al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia presentada en la SEQ ID NO: 6. En algunos aspectos, una proteína ActRIIB comprende una secuencia que difiere en menos de 1–2, 1, 2, 3, 4, o 5 aminoácidos de la secuencia presentada en la SEQ ID NO:6. En algunos aspectos, una proteína inhibe al menos dos de activina, miostatina y GDF-11. En algunos aspectos, una

proteína inhibe activina, miostatina y GDF–11. En algunos aspectos, una proteína inhibe la activina.

[0025] Como se usa en la presente, el término “miembros de la familia de TGF– β ” o “proteínas TGF– β ” se refiere a los factores de crecimiento relacionados estructuralmente de la familia del factor de crecimiento transformante incluyendo las proteínas activinas y el factor de crecimiento y diferenciación (GDF) (Kingsley et al. *Genes Dev.* 8: 133–146 (1994), McPherron et al., *Growth factors and cytokines in health and disease*, Vol. 1B, D. LeRoith y C. Bondy. ed., JAI Press Inc., Greenwich, Conn, USA: pp 357–393).

[0026] El GDF–8, denominado también miostatina, es un regulador negativo del tejido muscular esquelético (McPherron et al. *PNAS USA* 94:12457–12461 (1997)). La miostatina es sintetizada como una proteína inactiva de aproximadamente 375 aminoácidos de longitud, que tiene el No. de acceso al GenBank: AAB86694 para humanos. La proteína precursora es activada por escisión proteolítica en un sitio de procesamiento tetrabásico para producir un prodominio inactivo N–terminal y una proteína C–terminal de aproximadamente 109 aminoácidos que se dimeriza para formar un homodímero de aproximadamente 25 kDa. Este homodímero es la proteína madura, biológicamente activa (Zimmers et al., *Science* 296, 1486 (2002)).

[0027] Como se usa en la presente, el término “prodominio” o “propéptido” se refiere a la proteína N–terminal inactiva que es escindida para liberar la proteína C–terminal activa. Como se usa en la presente, el término “miostatina” o “miostatina madura” se refiere al polipéptido C–terminal maduro, biológicamente activo, en forma de monómero, dímero u otra forma, así como también fragmentos biológicamente activos o polipéptidos relacionados, incluyendo variantes alélicas, variantes de corte y empalme, y péptidos de fusión y polipéptidos. Se ha informado que la miostatina madura tiene 100% de identidad de secuencia entre muchas especies incluyendo humanos, ratón, pollos, porcinos, pavos y ratas (Lee et al., *PNAS* 98, 9306 (2001)).

[0028] Como se usa en la presente, GDF–11 se refiere a la BMP (proteína morfogénica ósea) que tiene el número de acceso Swissprot O95390, así como también a variantes y especies homólogas de esa proteína. La GDF–11 está involucrada en la regulación del patrón anterior/posterior del esqueleto axial (McPherron et al, *Nature Genet.* 22 (93): 260–264 (1999); Gamer et al, *Dev. Biol.* 208 (1), 222–232 (1999)) pero se desconocen las funciones postnatales.

[0029] La activina A es el homodímero de las cadenas de polipéptido β A. Como se usa en la presente, el término “activina A” se refiere a la proteína activina que tiene el No. de acceso de GenBank: NM_002192. Las activinas A, B, y AB son los homodímeros y el heterodímero,

respectivamente, de dos cadenas de polipéptidos, β A y β B. Como se usa en la presente, “activina” se refiere a la activina A, B, y AB, así como también a variantes y especies homólogas de esa proteína.

[0030] Polipéptidos receptores

[0031] Como se usa en la presente, el término receptores de activina tipo II B (ActRIIB) se refiere a los receptores de activina humanos que tienen el número de acceso NP_001097 o sus variantes, tales como aquellas que tienen arginina en la posición 64 sustituida con alanina. El término ActRIIB soluble (tipo salvaje) se refiere al dominio extracelular de ActRIIB, por ejemplo, los aminoácidos 1 a 134 (con la secuencia señal), o los aminoácidos 19 a 134 de la SEQ ID NO: 2 (sin la secuencia señal), o los aminoácidos 20, 21, 22, 23, 24 o 25 a 134 de la SEQ ID NO: 2 (sin la secuencia señal).

[0032] Polipéptidos receptores estabilizados

[0033] También se proporciona en la presente una proteína aislada que comprende un polipéptido receptor de ActRIIB estabilizado (denominado en la presente “polipéptido svActRIIB”). Como se usa en la presente, el término “proteína svActRIIB” se refiere a una proteína que comprende un polipéptido ActRIIB estabilizado. Estos polipéptidos y proteínas están caracterizadas porque tienen la capacidad de ligar e inhibir la actividad de cualquier activina A, miostatina o GDF–11, además de tener características de elaboración mejoradas.

[0034] El polipéptido ActRIIB estabilizado puede ser caracterizado porque tiene una sustitución de aminoácidos en las posiciones 28 y 44 con respecto a la SEQ ID NO: 2. Para mantener la coherencia, las posiciones de los aminoácidos en las proteínas y los polipéptidos ActRIIB estabilizados están referidas con respecto a las posiciones en la SEQ ID NO: 2, independientemente de que el polipéptido sea maduro o truncado. Como se usa en la presente, el término “maduro” se refiere a un polipéptido o péptido sin su secuencia señal. Como se usa en la presente, el término “truncado” se refiere a polipéptidos en los que se eliminaron los aminoácidos N–terminales o los aminoácidos C–terminales.

[0035] En una forma de realización, el polipéptido receptor de activina IIB estabilizado aislado (svActRIIB) tiene la secuencia de polipéptidos presentada en la SEQ ID NO: 2. En otra forma de realización, el polipéptido tiene la secuencia presentada en los aminoácidos 19 a 134 de la SEQ ID NO: 2. En otra forma de realización, el polipéptido tiene la secuencia presentada en los aminoácidos 23 a 134 de la SEQ ID NO: 2. En otra forma de realización, el polipéptido tiene la secuencia presentada en los aminoácidos 25 a 134 de la SEQ ID NO: 2. En otra forma de

realización, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con cualquiera de los polipéptidos mencionados más arriba. En una forma de realización, el polipéptido es capaz de ligar a la miostatina, la activina A o el GDF–11. En una forma de realización, el polipéptido receptor de activina IIB estabilizado aislado (svActRIIB) comprende una secuencia con al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia presentada en los aminoácidos 19–24, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 a 130–134, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 ó 134 de la SEQ ID NO: 2.

[0036] En una forma de realización, el polipéptido receptor de activina IIB estabilizado aislado (svActRIIB) tiene la secuencia de polipéptidos presentada en la SEQ ID NO: 2, excepto por una sustitución de aminoácidos en la posición 28, y una sustitución de aminoácidos en la posición 44, donde la sustitución en la posición 28 es seleccionada de W o Y, y la sustitución en la posición 44 es T. En otra forma de realización, el polipéptido tiene la secuencia presentada en los aminoácidos 19 a 134 de la SEQ ID NO: 2, excepto por una sustitución de aminoácidos en la posición 28, y una sustitución de aminoácidos en la posición 44, donde la sustitución en la posición 28 es seleccionada de W o Y, y la sustitución en la posición 44 es T. En otra forma de realización, el polipéptido tiene la secuencia presentada en los aminoácidos 23 a 134 de la SEQ ID NO: 2, excepto por una sustitución de aminoácidos en la posición 28, y una sustitución de aminoácidos en la posición 44, donde la sustitución en la posición 28 es seleccionada de W o Y, y la sustitución en la posición 44 es T. En otra forma de realización, el polipéptido tiene la secuencia presentada en los aminoácidos 25 a 134 de la SEQ ID NO: 2, excepto por una sustitución de aminoácidos en la posición 28, y una sustitución de aminoácidos en la posición 44, donde la sustitución en la posición 28 es seleccionada de W o Y, y la sustitución en la posición 44 es T. En otra forma de realización, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con cualquiera de los polipéptidos mencionados más arriba, donde el polipéptido tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 28, y una sustitución de aminoácidos en la posición 44, opcionalmente donde la sustitución en la posición 28 es seleccionada de W o Y, y la sustitución en la posición 44 es T, y donde el polipéptido es capaz de ligar a la miostatina, la activina A o el GDF–11. En una forma de realización, la sustitución de los polipéptidos arriba mencionados en la posición 28 es W, y la sustitución en la posición 44 es T, donde el polipéptido es capaz de ligar a la miostatina, la activina A o el GDF–11.

[0037] En una forma de realización, el polipéptido svActRIIB incluye una secuencia señal, por ejemplo, las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 4, 8, 12, y 16. Sin embargo, varios péptidos señal se pueden usar en la preparación de los polipéptidos de la presente solicitud. Los péptidos señal pueden tener la secuencia presentada en los aminoácidos 1 a 19 de la SEQ ID NO: 4, por ejemplo. Se pueden usar cualesquiera otros péptidos señal útiles para expresar los polipéptidos svActRIIB. En otras formas de realización, la secuencia señal es retirada, dejando el péptido maduro. Ejemplos de polipéptidos svActRIIB que no tienen una secuencia señal incluyen, por ejemplo, las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 6, 10, 14 y 18.

[0038] En una forma de realización, la proteína comprende un polipéptido receptor de activina IIB estabilizado, donde el polipéptido es seleccionado del grupo que consiste en polipéptidos que tienen la secuencia presentada en el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, 6, 12 y 14. Estos polipéptidos representan a los aminoácidos 25 a 134 de la SEQ ID NO: 2, donde el polipéptido tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 28, y una sustitución de aminoácidos en la posición 44, donde la sustitución en la posición 28 es seleccionada de W o Y, y la sustitución en la posición 44 es T, y donde el polipéptido es capaz de ligar a la miostatina, la activina A, o el GDF–11, con y sin una secuencia señal diferente de la mostrada en la SEQ ID NO: 2. En otra forma de realización, la proteína comprende un polipéptido que tiene al menos 80–100%, 90–100%, 85–95%, 90–95%, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4, 6, 12 ó 14, opcionalmente donde el polipéptido tiene un W o Y en la posición 28 y un T en la posición 44, y donde el polipéptido es capaz de ligar a la miostatina, la activina A o el GDF–11. En una forma de realización, la sustitución en la posición 28 es W y la sustitución en la posición 44 es T, donde el polipéptido es capaz de ligar a la miostatina, la activina A o el GDF–11.

[0039] En otra forma de realización, la proteína svActRIIB comprende además una proteína heteróloga. En una forma de realización, la proteína heteróloga es un dominio Fc. En otra forma de realización, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG humana. En una forma de realización, la proteína comprende un polipéptido que tiene la secuencia presentada en el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 8, 10, 16 y 18. En otra forma de realización, la proteína comprende un polipéptido que tiene al menos 80–100%, 90–100%, 85–95%, 90–95%, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 8, 10, 16 o 18, opcionalmente donde el polipéptido tiene un W o Y en la posición 28 y un T en la posición 44, y donde el polipéptido es capaz de ligar a la miostatina, la activina A, o el GDF–11. En una forma

de realización, la sustitución en la posición 28 es W y la sustitución en la posición 44 es T, donde el polipéptido es capaz de ligar a la miostatina, la activina A o el GDF–11. En algunos aspectos, la proteína comprende o consiste en, la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:10. En algunos aspectos, la secuencia es glicosilada.

[0040] En otra forma de realización, la proteína svActRIIB es STM 434, descrita en los Ejemplos.

[0041] En otra forma de realización, la proteína comprende uno cualquiera de los polipéptidos descritos más arriba, donde el residuo de aminoácido en la posición 64 es alanina.

[0042] En otra forma de realización, el término proteína y polipéptido svActRIIB comprende proteínas que comprenden fragmentos de la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 12 y 14, incluyendo truncados N y C terminales, donde la posición 28 es W o Y, y la posición 44 es T, y donde el polipéptido es capaz de ligar a la miostatina, la activina A o el GDF–11.

[0043] Como se usa en la presente, el término “derivado” de un polipéptido svActRIIB se refiere a la unión de al menos una parte química adicional, o al menos un polipéptido adicional para formar conjugados covalentes o agregados, tales como grupos glicosililo, lípidos, grupos acetilo o polipéptidos de fusión C–terminales o N–terminales, conjugación de moléculas PEG, y otras modificaciones que se describen más completamente más abajo. Los polipéptidos receptores de ActRIIB estabilizados también pueden incluir modificaciones y derivados adicionales, incluyendo modificaciones a los extremos C y N que provienen del procesamiento debido a la expresión en varios tipos de células, tales como las células de mamíferos, de E. coli, levaduras y otras células huésped recombinantes.

[0044] Las proteínas svActRIIB pueden comprender además polipéptidos heterólogos unidos al polipéptido svActRIIB ya sea directamente o a través de un ligador para formar una proteína de fusión. Como se usa en la presente, el término “proteína de fusión” se refiere a una proteína que tiene un polipéptido heterólogo unido a otro polipéptido, tal como un svActRIIB. Los polipéptidos heterólogos incluyen, pero no están limitados a, polipéptidos Fc, sus marcas, y dominios cremallera de leucina para promover la oligomerización y la estabilización adicional de los polipéptidos ActRIIB estabilizados, como se describe, por ejemplo, en la WO 00/29581, que se incorpora en la presente por referencia. En una forma de realización, el polipéptido heterólogo es un polipéptido o dominio Fc. En una forma de realización, el dominio Fc es seleccionado de un dominio Fc de IgG1 humano (SEQ ID NO: 23), un Fc de IgG1 modificado, Fc de IgG2 (SEQ ID NO: 22) y Fc de IgG4 (SEQ ID NO: 24). La proteína SvActRIIB puede comprender además toda o

una parte de la secuencia bisagra de la IgG1, la IgG2 o la IgG4. Los polipéptidos svActRIIB ilustrativos son seleccionados de los polipéptidos que consisten en las secuencias como se presentan en las SEQ ID NOs: 8, 10, 16 y 18, así como también aquellos polipéptidos que tienen sustancial similitud con estas secuencias, donde las sustituciones en las posiciones 28 y 44 están retenidas. Como se usa en la presente, “similitud sustancial” se refiere a las secuencias que son al menos 80–100%, 90–100%, 85–95%, 90–95%, 80 % idénticas, 85 % idénticas, 90 % idénticas, 95 % idénticas, 96 % idénticas, 97 % idénticas, 98 % idénticas, 99 % idénticas a cualquiera de las SEQ ID NOs: 8, 10, 16, y 18, donde los polipéptidos retienen W o Y en la posición 28 y T en la posición 44, y donde el polipéptido es capaz de ligar la miostatina, la activina A o el GDF–11. En una forma de realización, la sustitución en la posición 28 es W y la sustitución en la posición 44 es T, donde el polipéptido es capaz de ligar la miostatina, la activina A o el GDF–11.

[0045] Los polipéptidos svActRIIB pueden comprender además opcionalmente un “ligador”. Los ligadores sirven principalmente como un espaciador entre un polipéptido y un segundo polipéptido heterólogo u otro tipo de fusión o entre dos o más polipéptidos ActRIIB estabilizados. En una forma de realización, un ligador está formado por aminoácidos ligados entre sí por enlaces peptídicos, preferentemente de 1 a 20 aminoácidos ligados por enlaces peptídicos, donde los aminoácidos son seleccionados de los 20 aminoácidos que existen naturalmente. Uno o más de estos aminoácidos pueden ser glicosilados, como es conocido por los expertos en el arte. En una forma de realización, los 1 a 20 aminoácidos pueden ser seleccionados de glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina, y lisina. En una forma de realización, un ligador está formado por una mayor parte de aminoácidos que no están estéricamente impedidos, tales como glicina y alanina. Los ligadores ilustrativos son poliglicinas, particularmente (Gly)₅ (SEQ ID NO: 51), (Gly)₈ (SEQ ID NO: 52), poli(Gly–Ala), y polialaninas. Un ligador adecuado ilustrativo es (Gly)₄Ser (SEQ ID NO: 25). En otra forma de realización, el svActRIIB puede comprender un “ligador bisagra”, que es una secuencia ligadora proporcionada adyacente a una región bisagra o una región bisagra parcial de una IgG, como se ilustra en la SEQ ID NO: 27. Las secuencias bisagra incluyen IgG2Fc, IgG1Fc e IgG4Fc.

[0046] Las secuencias ligadoras bisagra también pueden ser diseñadas para mejorar la capacidad de elaboración y la estabilidad de las proteínas svActRIIB–Fc. En una forma de realización, los ligadores bisagra de las SEQ ID NOs: 27, 38, 40, 42, 44, 45, y 46 están diseñados para mejorar la elaboración con la IgG2 Fc (SEQ ID NO: 22) cuando están unidos a los polipéptidos svActRIIB. En una forma de realización, las secuencias ligadoras bisagra están diseñadas para mejorar la

elaboración cuando unen a los polipéptidos svActRIIB a una IgG1 Fc (SEQ ID NO: 23) humana o una IgG1 Fc humana modificada.

[0047] Los ligadores también pueden ser ligadores no peptídicos. Por ejemplo, se pueden usar los ligadores alquilo tales como $\text{--NH--(CH}_2\text{)}_s\text{--C(O)--}$, donde $s = 2\text{--}20$. Estos ligadores alquilo pueden ser sustituidos además por cualquier grupo no estéricamente impedido tal como alquilo inferior (por ejemplo, $\text{C}_1\text{--C}_6$) acilo inferior, halógeno (por ejemplo, Cl, Br), CN, NH_2 , fenilo, etc.

[0048] Los polipéptidos svActRIIB divulgados en la presente también pueden ser unidos a una molécula que no es un polipéptido con el propósito de conferir las propiedades deseadas tales como reducir la degradación y/o aumentar la vida media, reducir la toxicidad, reducir la inmunogenicidad, y/o aumentar la actividad biológica de los polipéptidos svActRIIB. Las moléculas ilustrativas incluyen, pero no están limitadas a polímeros lineales, tales como polietilenglicol (PEG), polilisina, un dextrano; un lípido; un grupo de colesterol (tal como un esteroide); un carbohidrato, o una molécula de oligosacárido.

[0049] Las proteínas y los polipéptidos svActRIIB pueden tener propiedades de elaboración mejoradas en comparación con otros polipéptidos ActRIIB solubles. Como se usa en la presente, el término “elaboración” se refiere a la estabilidad de una proteína particular durante la expresión recombinante y la purificación de esa proteína. Se cree que la capacidad de elaboración se debe a las propiedades intrínsecas de la molécula bajo las condiciones de expresión y purificación. Ejemplos de características de mejor capacidad de elaboración incluyen glicosilación uniforme de una proteína, mayor título celular, crecimiento y expresión de la proteína durante la producción recombinante de la proteína, mejores propiedades de purificación y mejor estabilidad a bajo pH. Las proteínas y los polipéptidos svActRIIB demuestran la mejor capacidad de elaboración, junto con la retención de la actividad *in vitro* e *in vivo*, comparada con otros polipéptidos ActRIIB solubles. Además, las secuencias ligadoras bisagras adicionales pueden conferir beneficios de capacidad de elaboración adicionales.

[0050] Como se usa en la presente, el término una “actividad de polipéptido svActRIIB” o “una actividad biológica de un polipéptido ActRIIB soluble” se refiere a una o más actividades *in vitro* o *in vivo* de los polipéptidos svActRIIB. las actividades de los polipéptidos svActRIIB incluyen, pero no están limitadas a, la capacidad para unirse a miostatina o activina A o GDF-11, y la capacidad para inhibir o neutraliza una actividad de miostatina o activina A o GDF-11. Como se usa en la presente, el término “capaz de ligar” a miostatina, activina A, o GDF-11 se refiere a la ligación medida por métodos conocidos en el arte, tales como el método KinExA™. La inhibición

in vitro de miostatina, activina A, o GDF–11 puede ser medida usando, por ejemplo, el ensayo basado en células pMARE C2C12. La actividad *in vivo*, es demostrada por un aumento de la masa muscular magra en modelos de ratón. Las actividades *in vivo* de los polipéptidos y las proteínas svActRIIB incluyen, pero no están limitadas al aumento del peso corporal, al aumento de la masa muscular magra, y al aumento de la relación entre músculo magro y masa grasa. Las actividades terapéuticas incluyen además reducir o prevenir la caquexia causada por algunos tipos de tumores, prevenir el crecimiento de algunos tipos de tumores, y aumentar la supervivencia de algunos modelos animales. Más abajo se presenta un comentario adicional sobre las actividades de las proteínas y polipéptidos svActRIIB.

[0051] En otro aspecto, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido svActRIIB.

[0052] En una forma de realización, el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene la secuencia presentada en la SEQ ID NO: 2, excepto por una sustitución de aminoácidos en la posición 28, y una sustitución de aminoácidos en la posición 44, donde la sustitución en la posición 28 es seleccionada de W o Y, y la sustitución en la posición 44 es T. En otra forma de realización, el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene la secuencia presentada en los aminoácidos 19 a 134 de la SEQ ID NO: 2, excepto por una sustitución de aminoácidos en la posición 28, y una sustitución de aminoácidos en la posición 44, donde la sustitución en la posición 28 es seleccionada de W o Y, y la sustitución en la posición 44 es T. En otra forma de realización, el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene la secuencia presentada en los aminoácidos 23 a 134 de la SEQ ID NO: 2, excepto por una sustitución de aminoácidos en la posición 28, y una sustitución de aminoácidos en la posición 44, donde la sustitución en la posición 28 es seleccionada de W o Y, y la sustitución en la posición 44 es T. En otra forma de realización, el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene la secuencia presentada en los aminoácidos 25 a 134 de la SEQ ID NO: 2, excepto por una sustitución de aminoácidos en la posición 28, y una sustitución de aminoácidos en la posición 44, donde la sustitución en la posición 28 es seleccionada de W o Y, y la sustitución en la posición 44 es T. En otra forma de realización, el polinucleótido codifica el polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 80–100%, 90–100%, 85–95%, 90–95%, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad con uno cualquiera de los polipéptidos mencionados más arriba, donde el polipéptido tiene una sustitución de aminoácidos única en la posición 28, y una sustitución de aminoácidos en la posición 44, opcionalmente donde la sustitución en la posición 28 es seleccionada de W o Y, y

la sustitución en la posición 44 es T, y donde el polipéptido es capaz de ligar a la miostatina, la activina A o el GDF–11. En una forma de realización, el polinucleótido de las formas de realización arriba mencionadas codifica un polipéptido donde la sustitución en la posición 28 es W y la sustitución en la posición 44 es T.

[0053] En una forma de realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia presentada en el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 4, 6, 12, y 14. En otra forma de realización, el ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos 80–100%, 90–100%, 85–95%, 90–95%, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NOs: 4, 6, 12 ó 14, opcionalmente donde el polipéptido tiene un W o Y en la posición 28 y un T en la posición 44, y donde el polipéptido es capaz de unirse a la activina A, el GDF–11, o la miostatina. En una forma de realización, el polinucleótido de las formas de realización arriba mencionadas codifica un polipéptido donde la sustitución en la posición 28 es W y la sustitución en la posición 44 es T, y donde el polipéptido es capaz de ligarse a la activina A, el GDF–11 o la miostatina.

[0054] En otra forma de realización, una molécula de ácido nucleico aislada comprende además un polinucleótido que codifica al menos una proteína heteróloga. En una forma de realización, la proteína heteróloga es un dominio Fc, en otra forma de realización, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG humano. En otra forma de realización, la molécula de ácido nucleico comprende además polinucleótidos que codifican ligadores y ligadores bisagra presentados en, por ejemplo, las SEQ ID NOs: 25, 27.

[0055] En una forma de realización, la molécula de ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia presentada en el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 8, 10, 16 y 18. En otra forma de realización, el ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos 80–100%, 90–100%, 85–95%, 90–95%, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 8, 10, 16 y 18, opcionalmente donde el polipéptido tiene un W o Y en la posición 28 y un T en la posición 44, y donde el polipéptido es capaz de ligarse a activina A, GDF–11, o miostatina. En una forma de realización, el polinucleótido de las formas de realización arriba mencionadas codifica un polipéptido donde la sustitución en la posición 28 es W y la sustitución en la posición 44 es T, y donde el polipéptido es capaz de ligarse a miostatina, activina A o GDF–11.

[0056] En una forma de realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende un polinucleótido que tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 3, 5, 11 o 13, o su complemento. En otra forma de realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende un polinucleótido que tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NOs: 7, 9, 15 y 17, o su complemento. En otra forma de realización la molécula de ácido nucleico aislada se hibrida bajo condiciones rigurosas o moderadas con la SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 ó 17 donde el polipéptido codificado es sustancialmente similar a la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 ó 18, opcionalmente donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene W o Y en la posición 28, y T en la posición 44, y donde el polipéptido codificado es capaz de ligar o inhibir a la activina A, la miostatina o el GDF–11.

[0057] Las moléculas de ácido nucleico incluyen ADN en la forma de hebra simple y de hebra doble, así como también el complemento ARN de éste. El ADN incluye, por ejemplo, cADN, ADN genómico, ADN sintético, ADN amplificado por PCR, y sus combinaciones. El ADN genómico puede ser aislado por técnicas convencionales, tales como mediante el uso de ADN de la SEQ ID NO: 3, 5, 11 o 13, o un fragmento adecuado de éste como una sonda. El ADN genómico que codifica los polipéptidos ActRIIB es obtenido de bibliotecas genómicas que se encuentran disponibles para una cantidad de especies. El ADN sintético se encuentra disponible de síntesis químicas de fragmentos de oligonucleótidos que se superponen seguido por el ensamblado de los fragmentos para reconstituir parte o todas las regiones codificadoras y las secuencias flanqueadoras. El ARN puede ser obtenido de vectores de expresión procariótica que dirigen la síntesis a alto nivel directa de mRNA, tales como los vectores que usan promotores T7 y ARN polimerasa. El cADN es obtenido de bibliotecas preparadas de mRNA aislado de varios tejidos que expresan ActRIIB. Las moléculas de ADN incluyen genes de longitud completa así como también polinucleótidos y fragmentos de estos. El gen de longitud completa también puede incluir secuencias que codifican la secuencia señal N–terminal.

[0058] También se proporciona la molécula de ácido nucleico descrita más arriba, donde el polinucleótido está unido operativamente a una secuencia reguladora transcripcional o traduccional.

[0059] En otro aspecto, también se proporcionan los vectores de expresión que contienen las moléculas de ácido nucleico y los polinucleótidos, y células huésped transformadas con tales vectores, y también se proporcionan métodos para producir los polipéptidos svActRIIB. La expresión “vector de expresión” se refiere a un plásmido, fago, virus o vector para expresar un

polipéptido de una secuencia de polinucleótidos. Los vectores para la expresión de los polipéptidos svActRIIB contienen en un mínimo secuencias requeridas para la propagación del vector y para la expresión del inserto clonado. Un vector de expresión comprende una unidad transcripcional que comprende un conjunto de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen un rol regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores o intensificadores, (2) una secuencia que codifica polipéptidos y proteínas svActRIIB para ser transcritas en mRNA y traducidas en proteínas, y (3) secuencias de iniciación y terminación de la transcripción apropiadas. Estas secuencias pueden incluir además un marcador de selección. Los vectores adecuados para la expresión en las células huésped se encuentran fácilmente disponibles y las moléculas de ácido nucleico son insertadas en los vectores usando técnicas de ADN recombinante estándar. Tales vectores pueden incluir promotores que funcionan en los tejidos específicos, y vectores virales para la expresión de los polipéptidos svActRIIB en células humanas o animales objetivo. Un vector de expresión ilustrativo para la expresión de svActRIIB es el pDSRa, (descrito en la WO 90/14363, incorporado en la presente por referencia) y sus derivados, que contienen polinucleótidos svActRIIB, así como también cualesquiera vectores adecuados adicionales conocidos en el arte o descritos más abajo.

Polipéptidos

[0060] En algunas formas de realización, las composiciones divulgadas en la presente incluyen un polipéptido que es menos de 100% idéntico a una secuencia de aminoácidos divulgada en la presente. En algunas formas de realización, el polipéptido es 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o entre 99 y 100% idéntico a una secuencia divulgada en la presente.

[0061] La expresión “por ciento idénticas” en el contexto de dos o más secuencias de aminoácidos o ácidos nucleico, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o residuos de aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para la máxima correspondencia, medida usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias descritos más abajo (por ejemplo, BLASTP y BLASTN u otros algoritmos disponibles para los expertos en el arte) o por inspección visual. Dependiendo de la aplicación, el porcentaje de identidad puede existir en una región de la secuencia que es comparada, por ejemplo, en un dominio funcional, o, alternativamente, existe en la longitud completa de las dos secuencias a ser comparadas.

[0062] Para la comparación de las secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia a la cual se comparan las secuencias ensayadas. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias ensayadas y de referencia son ingresadas en una computadora, se diseñan las coordenadas de subsecuencias, si es necesario, y se diseñan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para la o las secuencias ensayadas con relación a la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa diseñados.

[0063] El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede ser realizado, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), por el método de búsqueda de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o por inspección visual (ver en general Ausubel et al., *infra*).

[0064] Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403–410 (1990). El software para realizar los análisis BLAST se encuentra disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Variantes

[0065] Las composiciones descritas en la presente también comprenden variantes de los polipéptidos descritos en la presente. Como se usa en la presente, el término “variantes” se refiere a polipéptidos que tienen uno o más residuos de aminoácidos insertados, delecionados o sustituidos en la secuencia de aminoácidos original y que retienen al menos una parte de la función del polipéptido descrito en la presente. Como se usa en la presente, los fragmentos de los polipéptidos están incluidos en la definición de “variantes”. Se entiende que cualquier péptido o cuerpo peptídico dado puede contener uno o dos o los tres tipos de variantes. Las variantes insercionales y sustitucionales pueden contener aminoácidos naturales, así como también aminoácidos que no existen naturalmente o ambos. Las variantes pueden incluir, por ejemplo, polipéptidos que incluyen un líder o secuencia señal; polipéptidos con residuos amino terminales

adicionales, por ejemplo, Met1 o Lys 2; polipéptidos con marcas de expresión, por ejemplo, marcas de histidina; y polipéptidos expresados como proteínas de fusión.

[0066] Las variantes de los polipéptidos descritos en la presente pueden incluir sustituciones de aminoácidos. Estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales (que existen naturalmente), aminoácidos que no existen naturalmente, tales como aminoácidos α , α -disustituidos, aminoácidos N-alquilo, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos de la presente invención. Ejemplos de aminoácidos que no existen naturalmente incluyen, por ejemplo: ácido aminoadípico, beta-alanina, ácido beta-aminopropiónico, ácido aminobutírico, ácido piperidínico, ácido aminocaproico, ácido aminoheptanoico, ácido aminoisobutírico, ácido aminopimélico, ácido diaminobutírico, desmosina, ácido diaminopimélico, ácido diaminopropiónico, N-etilglicina, N-etilasparagina, hidroxilisina, allo-hidroxilisina, hidroxiprolina, isodesmosina, allo-isoleucina, N-metilglicina, sarcosina, N-metilisoleucina, N-metilvalina, norvalina, norleucina, oritina, 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetilisina, ϵ -N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina, y otros aminoácidos y aminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina).

[0067] Los residuos que existen naturalmente pueden ser divididos en clases (superpuestas) en base a las propiedades de cadena lateral comunes:

- 1) hidrofóbicos neutros: Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Trp, Met, Phe;
- 2) polares neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr, Gly;
- 3) ácidos: Asp, Glu;
- 4) básicos: His, Lys, Arg;
- 5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
- 6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

[0068] La sustitución con aminoácidos que existen naturalmente puede ser conservadora o no conservadora. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras comprenden el intercambio de un miembro de una de las clases arriba mencionadas por otro miembro de la misma clase. Los cambios conservadores pueden comprender residuos de aminoácidos no convencionales, que son incorporados típicamente por síntesis química de péptidos en lugar de por síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen peptidomiméticos y otras formas revertidas o invertidas de partes de aminoácidos.

Métodos de preparación

[0069] También se proviene métodos de preparación de los polipéptidos svActRIIB. Se pueden utilizar una variedad de otros sistemas de expresión/huésped. Estos sistemas incluyen, pero no están limitados a microorganismos tales como bacterias transformadas con bacteriófagos recombinantes, vectores de expresión de ADN plásmidos o cósmidos; levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras; sistemas celulares de insectos infectados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas celulares de plantas transfectados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, Ti o pBR322 plásmido); o sistemas celulares animales. Las células de mamíferos útiles en la producción de proteínas recombinantes incluyen, pero no están limitadas a células VERO, células HeLa, líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), o sus derivados, tales como CHO Veggie y líneas celulares relacionadas que crecen en medio libre de suero (ver Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28:31) o la cepa de CHO DX–B11, que es deficiente en DHFR (ver Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216–20) células COS, tales como la línea COS–7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (ver Gluzman et al., 1981, Cell 23:175), W138, BHK, HepG2, 3T3 (ATCC CCL 163), RIN, MDCK, A549, PC12, K562, células L, células C127, líneas celulares BHK (ATCC CRL 10), la línea celular CV1/EBNA derivada de la línea celular de riñón de mono verde africano CV1 (ATCC CCL 70) (ver McMahan et al., 1991, EMBO J. 10:2821), células de riñón embrionario humano, tales como 293, 293 EBNA o MSR 293, células A431 epidérmicas humanas, células Colo205 humanas, otras líneas celulares de primates transformadas, células diploides dinormales, cepas de células derivadas de cultivo *in vitro* de tejido primario, explantes primarios, células HL–60, U937, HaK o Jurkat. La expresión en mamíferos permite la producción de polipéptidos segregados o solubles que pueden ser recuperados del medio de cultivo.

[0070] Usando un sistema de huésped–vector apropiado, los polipéptidos svActRIIB son producidos en forma recombinante cultivando una célula huésped transformada con un vector de expresión que contiene las moléculas de ácido nucleico bajo condiciones que permiten la producción. Las células transformadas se pueden usar para una producción de polipéptidos de alto rendimiento, de largo plazo. Una vez que tales células son transformadas con vectores que contienen marcadores seleccionables así como también el cassette de expresión deseado, las células pueden cultivarse en un medio enriquecido antes de pasarlas a un medio selectivo, por ejemplo. El

marcador seleccionable es diseñado para permitir el crecimiento y la recuperación de las células que expresan exitosamente las secuencias introducidas. Las aglomeraciones resistentes de células transformadas en forma estable pueden ser proliferadas usando técnicas de cultivo de tejido apropiadas para la línea celular empleada. Un panorama de la expresión de proteínas recombinantes se encuentra en *Methods of Enzymology*, v. 185, Goeddel, D.V., ed., Academic Press (1990).

[0071] En algunos casos, tales como en la expresión usando sistemas procarióticos, los polipéptidos expresados pueden necesitar ser “replegados” y oxidados en una estructura terciaria adecuada y generar uniones disulfuro para ser biológicamente activos. El replegado se puede lograr usando una cantidad de procedimientos bien conocidos en el arte. Tales métodos incluyen, por ejemplo, exponer el polipéptido solubilizado a un pH usualmente por encima de 7 en presencia de un agente caotrópico. La selección del caotrópico es similar a las elecciones usadas para la solubilización de cuerpos de inclusión, sin embargo un caotrópico se usa típicamente a una concentración menor. Agentes caotrópicos ilustrativos son guanidina y urea. En la mayoría de los casos, la solución de replegado/oxidación contendrá también un agente reductor más su forma oxidada en una relación específica para generar un potencial redox particular que permite que ocurra un barajado de disulfuro para la formación de puentes de cisteína. Algunos pares redox usados comúnmente incluyen cisteína/cistamina, glutatión/ditiobisGSH, cloruro cúprico, ditiotretitol DTT/ditiano DTT, y 2–mercaptoetanol (bME)/ditio–bME. En muchos casos, se puede usar un cosolvente para aumentar la eficiencia del replegado. Los cosolventes usados comúnmente incluyen glicerol, polietilenglicol de varios pesos moleculares y arginina.

[0072] Además, los polipéptidos pueden ser sintetizados en solución o en un soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales. Varios sintetizadores automáticos se encuentran disponibles comercialmente y se pueden usar de acuerdo con los protocolos conocidos. Ver, por ejemplo, Stewart y Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2d.Ed., Pierce Chemical Co. (1984); Tam et al., *J Am Chem Soc*, 105:6442, (1983); Merrifield, *Science* 232:341–347 (1986); Barany y Merrifield, *The Peptides*, Gross y Meienhdeer, eds, Academic Press, Nueva York, 1–284; Barany et al., *Int J Pep Proteína Res*, 30:705–739 (1987).

[0073] Los polipéptidos y las proteínas pueden ser purificados de acuerdo con técnicas de purificación de proteínas bien conocidas por los expertos en el arte. Estas técnicas comprenden, en un nivel, el fraccionamiento crudo de las fracciones proteináceas y no proteináceas. Habiendo separado los polipéptidos o péptidos de otras proteínas, el péptido o polipéptido de interés puede

ser purificado adicionalmente usando técnicas cromatográficas y electroforéticas para lograr la purificación parcial o completa (o purificación a homogeneidad). La expresión “polipéptido aislado” o “polipéptido purificado” como se usa en la presente, se refiere a una composición, que se puede aislar de otros componentes, donde el polipéptido es purificado a cualquier grado con relación a su estado que se obtiene naturalmente. Un polipéptido purificado por lo tanto también se refiere a un polipéptido que está libre del medio ambiente en el que existe naturalmente. En general, “purificado” se referirá a una composición de polipéptidos que ha sido sometida a fraccionamiento para remover varios otros componentes, y cuya composición retiene sustancialmente su actividad biológica expresada. Cuando se usa el término “sustancialmente purificado”, esta denominación se referirá a una composición de péptido o polipéptido en la cual el polipéptido o péptido forma el mayor componente de la composición, tal como constituyendo aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, o aproximadamente 90 % o más de las proteínas en la composición. El término aislado puede incluir un componente sintetizado, tal como un polipéptido.

[0074] Varias técnicas adecuadas para usar en la purificación son bien conocidas por los expertos en el arte. Estas incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos (inmunoprecipitación) y similares o por desnaturalización por calor, seguido por centrifugación; cromatografía tal como cromatografía de afinidad (columnas de proteína-A), intercambio de iones, filtración en gel, fase inversa, hidroxilapatita, cromatografía de interacción hidrofóbica, enfoque isoelectrico, electroforesis en gel, y combinaciones de estas técnicas. Como se conoce en general en el arte, se cree que el orden de realización de los diversos pasos de purificación puede cambiarse, o que pueden omitirse algunos pasos, y aun resultará un método adecuado para la preparación de un polipéptido sustancialmente purificado. Los pasos de purificación ilustrativos se proporcionan en los Ejemplos más abajo.

[0075] Varios métodos para cuantificar el grado de purificación del polipéptido son conocidos por los expertos en el arte a la luz de la presente divulgación. Estos incluyen, por ejemplo, determinar la actividad de ligación específica de una fracción activa, o evaluar la cantidad de péptido o polipéptido dentro de una fracción por análisis SDS/PAGE. Un método preferido para determinar la pureza de una fracción de polipéptido es calcular la actividad ligadora de la fracción, para compararla con la actividad ligadora del extracto inicial, y así calcular el grado de purificación, en la presente determinado por un “número de purificación de n-veces.” Las unidades reales usadas para representar la cantidad de actividad ligadora dependerán, por supuesto, de la técnica de

ensayo particular elegida para seguir la purificación y si el polipéptido o péptido exhibe una actividad ligadora detectable o no.

Métodos de tratamiento

[0076] También se proporcionan métodos, proteínas y composiciones para reducir o neutralizar la cantidad o la actividad de al menos uno de miostatina, activina A o GDF–11 *in vivo* e *in vitro*. Los polipéptidos svActRIIB tienen una alta afinidad de ligarse a la miostatina, la activina A, y el GDF–11, y son capaces de reducir e inhibir las actividades biológicas de al menos uno de miostatina, activina A y GDF–11. En algunos aspectos, una proteína es un anticuerpo o una proteína de fusión Fc. En algunos aspectos, una proteína de fusión Fc es una proteína de fusión Fc ActRIIB. En algunos aspectos, una proteína de fusión Fc ActRIIB comprende una secuencia con al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad con la secuencia presentada en los aminoácidos 19–25, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 a 130–134, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 ó 134 de la SEQ ID NO: 2, opcionalmente donde el Fc es IgG, opcionalmente donde IgG es IgG humana. En algunos aspectos, una proteína de fusión Fc ActRIIB comprende o consiste en la secuencia presentada en la SEQ ID NO:6 o la SEQ ID NO:10. En algunos aspectos, una proteína inhibe al menos dos de activina, miostatina y GDF–11. En algunos aspectos, una proteína inhibe activina, miostatina y GDF–11. En algunos aspectos, una proteína inhibe activina.

[0077] En un aspecto, se proporcionan métodos y reactivos para tratar trastornos relacionados con miostatina y/o relacionados con activina A en un sujeto que necesita tal tratamiento mediante la administración de una dosis efectiva de una composición de svActRIIB al sujeto. Tal como se usa en la presente, el término “sujeto” se refiere a cualquier animal, tal como mamíferos, que incluye los seres humanos.

[0078] Las composiciones son útiles para aumentar la masa muscular magra en un sujeto. Las composiciones también pueden ser útiles para aumentar la masa muscular magra en proporción con la masa de grasa, y por lo tanto disminuir la masa de grasa como porcentaje del peso corporal en un sujeto.

[0079] Los trastornos que se pueden tratar con svActRIIB incluyen, pero sin limitación varias formas de debilitamiento muscular, así como trastornos metabólicos tales como diabetes y trastornos relacionados, y enfermedades degenerativas óseas tales como la osteoporosis.

[0080] Los trastornos de debilitamiento muscular incluyen distrofias tales como la distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular progresiva, distrofia muscular de tipo Becker, distrofia

muscular de Dejerine–Landouzy, distrofia muscular de Erb, y distrofia muscular neuroaxonal infantil. Los trastornos de debilitamiento muscular adicionales surgen de enfermedades o trastornos crónicos tales como la esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva, cáncer, SIDA, insuficiencia renal, atrofia de órganos, privación de andrógenos, y artritis reumatoidea.

[0081] La sobreexpresión de la miostatina y/o activina pueden contribuir a la caquexia, un músculo de debilitamiento muscular grave. La caquexia proviene del cáncer, y también se presenta debido a la artritis reumatoidea, nefropatía diabética, insuficiencia renal, quimioterapia, lesión debido a quemaduras, así como otras causas. En otro ejemplo, se halló que las concentraciones séricas e intramusculares de proteína inmunorreactiva de miostatina está aumentada en los hombres que presentan debilitamiento muscular relacionado con el SIDA e inversamente relacionada con la masa libre de grasa (Gonzalez–Cadavid et al., PNAS USA 95: 14938–14943 (1998)). También se ha demostrado que los niveles de miostatina aumentan en respuesta a las lesiones por quemadura, lo que produce un efecto muscular catabólico (Lang et al, FASEB J 15, 1807–1809 (2001)). Otras afecciones que producen debilitamiento muscular pueden surgir de la inactividad debido a una discapacidad, tal como el confinamiento en una silla de ruedas, el reposo prolongado en cama debido a un accidente cerebrovascular, enfermedad, lesión de la médula espinal, fractura o trauma óseo, y atrofia muscular en un ambiente de microgravedad (vuelo espacial). Por ejemplo, se demostró que la proteína inmunorreactiva de miostatina plasmática aumenta después de un reposo prolongado en cama (Zachwieja et al. J Gravit Physiol. 6(2):11(1999). También se comprobó que los músculos de las ratas expuestas a un aumento de la cantidad miostatina en comparación con los músculos de las ratas que no se expusieron (Lalani et al., J. Endocrin 167 (3):417–28 (2000)).

[0082] Además, los aumentos relacionados con la edad en las relaciones de grasa a músculo, y atrofia muscular relacionada con la edad parece estar relacionado con miostatina. Por ejemplo, la proteína sérica inmunorreactiva de miostatina promedio aumentó con la edad en los grupos de hombres y mujeres jóvenes (19–35 años), mediana edad (36 a 75 años) y edad avanzada (76–92 años), mientras que la masa muscular y la masa libre de grasa promedio disminuyó con la edad en estos grupos Yarasheski et al. J Nutr Aging 6(5):343–8 (2002)). Además, en la actualidad se ha hallado que la miostatina se expresa en niveles bajos en músculo cardíaco y la expresión está regulada por aumento en los cardiomiocitos después del infarto (Sharma et al., J Cell Physiol. 180

(1):1–9 (1999)). Por lo tanto, la reducción de los niveles de miostatina en el músculo cardíaco puede mejorar la recuperación del músculo cardíaco después de infarto.

[0083] La miostatina también parece influir en los trastornos metabólicos que incluyen diabetes tipo 2, diabetes mellitus no insulino dependiente, hiperglucemia y obesidad. Por ejemplo, se ha demostrado que la falta de miostatina mejora los fenotipos obesos y diabéticos de dos modelos de ratones (Yen *et al.* *FASEB J.* 8:479 (1994). Los polipéptidos de svActRIIB de la presente descripción son adecuados para el tratamiento de tales trastornos metabólicos. Por lo tanto, la administración de las composiciones mejorará la diabetes, la obesidad, y afecciones hiperglucémicas en sujetos adecuados. Además, las composiciones que contienen polipéptidos de svActRIIB pueden disminuir la ingesta de alimentos en individuos obesos.

[0084] La administración de polipéptidos de ActRIIB estabilizados pueden mejorar la resistencia ósea y reducir la osteoporosis y otras enfermedades degenerativas óseas. Se ha encontrado, por ejemplo, que los ratones deficientes en miostatina mostraron un aumento del contenido y densidad mineral del húmero de ratón y aumento del mineral del hueso trabecular y cortical en las regiones donde los músculos se unen, así como aumento de la masa muscular (Hamrick *et al.*, *Calcif Tissue Int* 71 (1): 63–8 (2002)). Además, svActRIIBs se puede usar para tratar los efectos de la privación de andrógenos en casos tales como la terapia de privación de andrógenos usada, por ejemplo, para el tratamiento de cáncer de próstata.

[0085] También se proporcionan métodos y composiciones para aumentar la masa muscular en animales destinados al consumo mediante la administración de una dosis efectiva de proteínas svActRIIB al animal. Debido a que el polipéptido de miostatina C-terminal maduro es similar o idéntico en todas las especies estudiadas, se puede esperar que los polipéptidos svActRIIB sean efectivos para aumentar la masa muscular magra y reducir la grasa en cualquiera de las especies de importancia agrícola, que incluye ganado vacuno, pollo, pavos y cerdos.

[0086] En algunos aspectos, en la presente se describen métodos para tratar la obesidad o una enfermedad asociada con la obesidad, aumentar la masa muscular, o disminuir la masa grasa en un sujeto, que comprende: administrar al sujeto una dosis efectiva de una proteína que inhibe al menos una de activina, miostatina, y GDF-11.

[0087] En algunos aspectos, una enfermedad asociada con la obesidad es al menos uno de un síndrome de obesidad genética, síndrome de Prader Willi, un trastorno hipotalámico, hipercolesterolemia familiar, síndrome de Bardet-Biedl, síndrome de Prader-Willi, un síndrome resultante de una pérdida de genes sellados en 15q11–13, síndrome de Alstrom, síndrome de

Cohen, osteodistrofia hereditaria de Albright (pseudohipoparatiroidismo), síndrome de Carpenter, síndrome de MOMO, el síndrome de Rubinstein–Taybi, un síndrome resultante de las supresiones de al menos uno de 6q16, 1p36, 2q37 y 9q34, disomía uniparental materna del cromosoma 14, síndrome de X frágil, aterosclerosis, esteatohepatitis no alcohólica, una enfermedad donde la deposición de grasa visceral produce uno o más resultados nocivos, enfermedad cerebrovascular, hígado graso y síndrome Börjeson–Forssman–Lehman.

[0088] En algunos aspectos, un sujeto es un sujeto humano que necesita tratamiento o administración. En algunos aspectos, un sujeto tiene al menos uno de un síndrome genético de obesidad, síndrome de Prader Willi, un trastorno hipotalámico, hipercolesterolemia familiar, síndrome de Bardet–Biedl, síndrome de Prader–Willi, un síndrome que resultante de una pérdida de genes sellados en 15q11–13, síndrome de Alstrom, síndrome de Cohen, osteodistrofia hereditaria de Albright (pseudohipoparatiroidismo), síndrome de Carpenter, síndrome de MOMO, síndrome de Rubinstein–Taybi, un síndrome resultante de las supresiones de al menos uno de 6q16, 1p36, 2q37 y 9q34, disomía uniparental materna del cromosoma 14, síndrome de X frágil, aterosclerosis, esteatohepatitis no alcohólica, una enfermedad donde la deposición de grasa visceral produce uno o más resultados nocivos, enfermedad cerebrovascular, hígado graso y síndrome Börjeson–Forssman–Lehman. En algunos aspectos, un sujeto tiene al menos uno de resistencia a la insulina, enfermedad renal crónica, el cáncer, y una afección catabólica.

[0089] En algunos aspectos, una proteína es un anticuerpo o una proteína de fusión a Fc. En algunos aspectos, una proteína de fusión a Fc es una proteína de fusión a Fc ActRIIB. En algunos aspectos, una proteína de fusión a Fc ActRIIB comprende una secuencia con al menos 80%, 85%, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad con la secuencia expuesta en los aminoácidos 19–25, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 a 130–134, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 ó 134 de la SEQ ID NO: 2, opcionalmente donde Fc es IgG, opcionalmente donde IgG es IgG humana. En algunos aspectos, una proteína de fusión a Fc ActRIIB comprende o consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:10. En algunos aspectos, una proteína inhibe al menos dos de activina, miostatina, y GDF–11. En algunos aspectos, una proteína inhibe activina, miostatina, y GDF–11. En algunos aspectos, una proteína inhibe la activina.

[0090] En algunos aspectos, un método descrito en la presente disminuye al menos uno de masa grasa total, masa grasa subcutánea, y masa grasa visceral. En algunos aspectos, un método descrito en la presente produce mayor porcentaje de disminución de la masa grasa visceral con respecto al porcentaje de disminución de la masa grasa total. En algunos aspectos, un método

descrito en la presente aumenta al menos uno de masa corporal magra y masa magra apendicular. En algunos aspectos, un método descrito en la presente produce un aumento en al menos uno de masa corporal magra y masa magra apendicular en al menos 1–50%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, o more. En algunos aspectos, un método descrito en la presente produce una disminución en al menos una de masa grasa total, masa grasa subcutánea, y masa grasa visceral en al menos 1–99%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, o más.

[0091] Los polipéptidos y composiciones svActRIIB también antagonizan la actividad de activina A, como se muestra en los siguientes ensayos *in vitro*. Se sabe que la activina A se expresa en ciertos tipos de cánceres, particularmente tumores gonadales tales como carcinomas de ovario, y causar caquexia severa. . (Ciprano et al Endocrinol 141 (7): 2319–27 (2000), Shou et al, Endocrinol 138 (11): 5000–5 (1997); Coerver et al, Mol Endocrinol 10 (5): 534–43 (1996); Ito et al. British J Cancer 82(8):1415–20 (2000), Lambert–Messerlian, et al, Gynecologic Oncology 74:93–7 (1999). Por lo tanto, las composiciones de la presente descripción se pueden usar para tratar afecciones relacionadas con la sobreexpresión de activina A, así como la expresión de miostatina, tales como la caquexia de ciertos tipos de cáncer y el tratamiento de ciertos tumores de tipo gonadales.

[0092] Además, los polipéptidos svActRIIB son útiles para detectar y cuantificar la miostatina, activina A, o GDF–11 en numerosos ensayos. En general, los polipéptidos de ActRIIB estabilizados son útiles como agentes de captura para unir e inmovilizar miostatina, activina A, o GDF–11 en una variedad de ensayos, similar a los descritos, por ejemplo, en Asai, ed., *Methods in Cell Biology*, 37, *Antibodies in Cell Biology*, Academic Press, Inc., New York (1993). Los polipéptidos se pueden marcar de alguna manera o pueden reaccionar con una tercera molécula tal como un anticuerpo que está marcado para permitir detectar y cuantificar miostatina. Por ejemplo, un polipéptido o una tercera molécula se puede modificar con un resto detectable, tal como biotina, que luego se puede unir con una cuarta molécula, tal como estreptavidina marcada con enzima, u otras proteínas. (Akerstrom, *J Immunol* 135:2589 (1985); Chaubert, *Mod Pathol* 10:585 (1997)).

[0093] En algunos aspectos, una composición de la presente descripción se puede usar para tratar cánceres tales como tumores sólidos. Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por un crecimiento celular

desregulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma (que incluyen meduloblastoma y retinoblastoma), sarcoma (incluyendo liposarcoma y sarcoma de células sinoviales), tumores neuroendocrinos (que incluyen tumores carcinoides, gastrinoma, y cáncer de las células del islote), mesotelioma, schwannoma (que incluyen neuroma acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o neoplasias linfoides. Los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama (incluyendo cáncer de mama metastásico), cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, cáncer testicular, cáncer esofágico, tumores del tracto biliar, así como cáncer de cabeza y cuello. En algunos aspectos, una composición de la presente descripción se puede usar para tratar cánceres tales como estos o cáncer de ovario (tumores de células de la granulosa, células claras, serosas, endometrioides, germinales), cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, tumores intestinales pequeños, cáncer de colon, carcinoma de células renales, carcinoma adenoide quístico, cáncer gástrico, cáncer de esófago, carcinoma de células escamosas (piel), melanoma, cáncer de mama, carcinoma de vejiga, carcinoma hepatocelular, y cáncer de útero/o (endometrial, cervical, leiomioma, vulvar, vaginal).

[0094] Las dosis para usar con las proteínas y polipéptidos descritos en la presente pueden ser 0,1–10, 0,25–5, 1–3, 0,1, 0,2, 0,25, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,75, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, o mayor de 5 mg/kg, inclusive. En algunos aspectos cada dosis se puede administrar cada menos de 1–10, 2–9, 3–8, 4–7, 5–6, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o mayor de 8 semanas, inclusive. En algunos aspectos cada dosis se puede administrar cada menos de 1–10, 2–9, 3–8, 4–7, 5–6, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, inclusive. En algunos aspectos cada dosis se administra IV. En algunos aspectos, al sujeto se le administra al menos 1–30, 5–20, 5–10, 10–20, 15–20, 1–5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 dosis, inclusive. En algunos aspectos, la cantidad de al menos una de la pluralidad de dosis es al menos 0,3, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,

19 ó 20 mg/kg, inclusive. En algunos aspectos, la cantidad de cada una de la pluralidad de dosis es al menos 0,1–30, 0,25–20, 0,25–10, 1–5, 1–3, 0,1–1, 0,3, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 mg/kg, inclusive. En algunos aspectos, cada dosis se administra al menos en forma diaria, semanal o mensual. En algunos aspectos, cada dosis se administra al menos cada 1–30, 5–20, 5–10, 10–20, 15–20, 1–5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, o 31 días, inclusive. En algunos aspectos, el tratamiento continúa durante al menos 1–30, 5–20, 5–10, 10–20, 15–20, 1–5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, o 31 días; al menos 1–30, 5–20, 5–10, 10–20, 15–20, 1–5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 semanas; o al menos 1–30, 5–20, 5–10, 10–20, 15–20, 1–5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 meses, inclusive.

[0095] En algunos aspectos, se puede seleccionar un sujeto para el tratamiento de cáncer usando ciertos criterios, tales como criterios de inclusión o criterios de exclusión..

[0096] En algunos aspectos los criterios son los criterios de inclusión. En algunos aspectos, los criterios de inclusión pueden incluir: varones y mujeres posmenopáusicas ≥ 18 años, presencia de tumores sólidos avanzados con diagnóstico histológico que confirma el cáncer, presencia de enfermedad metastásica recurrente o localmente avanzado después del fracaso de al menos una línea de tratamiento estándar anterior (si está disponible), enfermedad medible mediante criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST 1.1), un estado funcional de Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) de 0 ó 1, capacidad para caminar al menos 30 metros sin ayuda de otra persona (se puede permitir el uso de dispositivos de asistencia tales como un bastón o andador), 12 meses de amenorrea espontánea en las mujeres posmenopáusicas, 6 meses de amenorrea espontánea con FSH > 40 UI/L en las mujeres posmenopáusicas, ooforectomía bilateral pos–quirúrgica con o sin histerectomía en mujeres posmenopáusicas, tratamiento previo con un régimen de quimioterapia basada en platino, y/o documentado incapaz de recibir la quimioterapia basada en platino.

[0097] En algunos aspectos, los criterios son los criterios de exclusión. En algunos aspectos, los criterios de exclusión pueden incluir: estado de salud no controlado grave concurrente o sin resolver (por ejemplo, infección) que limita el cumplimiento del protocolo o que expone el sujeto a riesgo extremo, toxicidades no resueltas de la terapia anticáncer anterior, tal como neuropatía motora o sensorial, con un CTCAE (versión 4,03) Grado ≥ 2 con la excepción de la alopecia, antecedentes de hemorragia gastrointestinal dentro de los 6 meses del tratamiento inicial, la

presencia de QTcF > 470 mseg, antecedentes de intervalo QT prolongado hereditario, o cualquier arritmia (tales como bloqueos de rama) que puede impedir la evaluación del intervalo QT, infarto de miocardio, angina inestable dentro de los 6 meses de ciclo 1 Día 1, o la insuficiencia cardíaca congestiva New York Heart Association $\geq$ clase II, pruebas de función hepática elevadas, que incluye bilirrubina total > 1,5 x el límite superior de la normalidad (ULN, a menos sujeto ha documentado la enfermedad de Gilbert), aspartato aminotransferasa (AST) o alanina aminotransferasa (ALT) > 3,0 x ULN (para los sujetos con metástasis hepática conocida, AST o ALT > 5 x ULN), creatinina > 1,5 x ULN y un depuración de creatinina estimada <60 ml/min (utilizando la ecuación de Cockcroft–Gault), hemoglobina <9 g/dl; plaquetas <100/10⁹/L; recuento absoluto de neutrófilos (ANC) <1,5 x 10⁹/L (sin soporte del factor de estimulante de colonias de granulocitos dentro de las 2 semanas de tratamiento inicial), quimioterapia, terapia hormonal o terapia de radiación dentro de 3 semanas de iniciar el tratamiento, la terapia con anticuerpos/biológica dentro de 4 semanas de iniciar el tratamiento, cirugía mayor dentro de 8 semanas o cirugía menor dentro de las 4 semanas de iniciar el tratamiento, obstrucción intestinal actual, metástasis cerebral, presencia de ascitis o derrame pleural que requieren frecuente intervención médica (más de 1 x por semana), presencia del dispositivo de derivación portal–venosa o resección hepática extendida (más de un segmento), infección por virus de la inmunodeficiencia humana conocida (VIH), infección con hepatitis B o C activa, tratamiento previo con cualquier producto en investigación dentro de las 4 semanas de iniciar el tratamiento, mujer en edad fértil, o varón con una pareja femenina en edad fértil, reticentes a utilizar un método anticonceptivo muy efectivo (es decir, uno que produce menos 1% de embarazo por año) cuando se usan de forma sistemática y correcta, tales como implantes, inyectables, anticonceptivos orales combinados, algunos dispositivos intrauterinos anticonceptivos, la abstinencia sexual, o un compañero vasectomizado, reacciones de hipersensibilidad a una formulación convencional de doxorubicina HCl o los componentes de la doxorubicina liposomal, dosis acumulativa de doxorubicina previa de HCl > 300 mg/m², o dosis acumulativa de epirubicina previa > 500 mg/m², disminución de la fracción de eyección cardíaca menor que el límite inferior normal por un barrido MUGA o un ecocardiograma (ECHO) de los 28 días de iniciar el tratamiento, y/o las mujeres que están en periodo de lactancia.

Composiciones y formulaciones farmacéuticas

[0098] También se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen proteínas y polipéptidos descritos en la presente. En algunos aspectos, una proteína es un anticuerpo o una

proteína de fusión a Fc. En algunos aspectos, una proteína de fusión a Fc es una proteína de fusión a Fc ActRIIB. En algunos aspectos, una proteína de fusión a Fc ActRIIB comprende una secuencia con al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad con la secuencia expuesta en los aminoácidos 19–25, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 a 130–134, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 ó 134 de la SEQ ID NO: 2, opcionalmente donde la Fc es IgG, opcionalmente donde IgG es IgG humana. En algunos aspectos, una proteína de fusión a Fc ActRIIB comprende o consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:10. En algunos aspectos, una proteína inhibe al menos dos de activina, miostatina, y GDF–11. En algunos aspectos, una proteína inhibe activina, miostatina, y GDF–11. En algunos aspectos, una proteína inhibe la activina.

[0099] Tales composiciones comprenden una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva del polipéptido o proteína en mezcla con materiales farmacéuticamente aceptables, y materiales de formulación fisiológicamente aceptables. La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, pH, osmolaridad, viscosidad, transparencia, color, isotonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución o liberación, adsorción o penetración de la composición. Los materiales de formulación adecuados incluyen, pero sin limitación aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrógeno sulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris–HCl, citratos, fosfatos, otros ácidos orgánicos); agentes de carga (tales como manitol o glicina), agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); agentes complejizantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta–ciclodextrina o hidroxipropil–beta–ciclodextrina); rellenos; monosacáridos; disacáridos y otros carbohidratos (tales como glucosa, manosa, o dextrinas); proteínas (tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas); colorantes; agentes aromatizantes y dilución; agentes emulsionantes; polímeros hidrofílicos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sales (tales como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); solventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como plurónicos, PEG, ésteres de sorbitano, polisorbato tales como polisorbato 20, polisorbato 80, tritón, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes

potenciadores de estabilidad (sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metal alcalino (con preferencia cloruro de sodio o potasio, sorbitol manitol); vehículos de administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos (de Remington Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, AR Gennaro, ed, Mack Publishing Company,. 1990).

[00100] Como se usa en la presente, el término "tampón" está destinado a significar una sustancia que estabiliza el pH de un líquido, ya sea su acidez o alcalinidad. El término tal como se usa en la presente se considera que se refiere a una solución con una sustancia tampón, tal como un ácido, en equilibrio con su base conjugada. Los ejemplos de tampones en una formulación descrita en la presente incluyen un tampón de fosfato de potasio. Los ejemplos de formas de sal de tampones que se pueden incluir en un tampón de la invención incluyen, por ejemplo, sal de sodio, potasio, calcio, amino orgánico o magnesio. El término "tampón" como se usa en la presente también está destinado a incluir todos los tampones distintos de tampón de fosfato de potasio que son bien conocidos para los expertos en la técnica y aplicable para su uso con productos biofarmacéuticos tales como polipéptidos terapéuticos. Dadas las enseñanzas y la orientación proporcionada en la presente, los expertos en la técnica entenderán que el tampón de fosfato de potasio se puede sustituir de igual modo con tampones diferentes en las formulaciones de la invención para mantener o mejorar la estabilidad de un polipéptido terapéutico. Se puede usar cualquiera de una amplia variedad de componentes del tampón bien conocidos en la técnica en una formulación de la invención. Tales componentes tampón incluyen, por ejemplo, ácido acético, ácido glutámico, ácido succínico, ácido propiónico, ácido maleico, gluconato, histidina u otros aminoácidos, citrato, fosfato, o sus formas de sales. Una amplia variedad de otros tampones que incluyen, por ejemplo, otros ácidos orgánicos, son bien conocidos en la técnica y se pueden usar de manera similar como un componente tampón en una formulación de la invención. Dadas las enseñanzas y la orientación proporcionada en la presente, los expertos en la técnica sabrán que cualquiera de los componentes de tampón anteriores u otros bien conocidos en la técnica se pueden seleccionar y utilizar en una formulación de la invención dado el pH deseado de la formulación y excipientes, si hubiera, incluido en la formulación. El componente tampón se puede suministrar al sistema tampón en una variedad de formas diferentes. En algunos aspectos, una formulación puede incluir 1–30, 5–20, 5–10, 10–20, 15–20, 1–5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, o mayor de 20 mM del tampón, inclusive.

[00101] Como se usa en la presente, el término "excipiente" significa una sustancia terapéuticamente inactiva. Los excipientes se pueden incluir en una formulación para una amplia

variedad de propósitos, que incluye, por ejemplo, como un diluyente, vehículo, tampón, estabilizante, agente de tonicidad, agente de carga, agente tensioactivo, crioprotector, lioprotector, anti-oxidante, fuente de iones metálicos, agente quelante y/o conservante. Los excipientes incluyen, por ejemplo, polioles tales como sorbitol o manitol; azúcares tales como sacarosa, lactosa o dextrosa; polímeros tales como polietilenglicol; sales tales como NaCl, KCl o fosfato de calcio, aminoácidos tales como glicina, metionina o ácido glutámico, tensioactivos, iones metálicos, sales tampón tales como propionato, acetato o succinato, conservantes y polipéptidos tales como albúmina sérica humana, así como solución salina y agua. Los excipientes particularmente útiles de la invención incluyen azúcares, incluyendo alcoholes de azúcar, azúcares reductores, azúcares no reductores y ácidos de azúcar. Los excipientes son bien conocidos en la técnica y se pueden hallar descritos en, por ejemplo, Wang W., *Int. J. Pharm.* 185: 129–88 (1999) y Wang W., *Int. J. Pharm.* 203: 1–60 (2000). Los azúcares no reductores contienen un carbono anomérico que es un acetal y no es sustancialmente reactivo con los aminoácidos o polipéptidos para iniciar una reacción de Maillard. Los azúcares que reducen la solución de Fehling o reactivo de Tollen también se conocen como azúcares reductores. Los ejemplos específicos de azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, sorbosa, sucralosa, melezitosa y rafinosa. Los excipientes tampón, por ejemplo mantienen el pH de las formulaciones líquidas a través de vida útil del producto y mantienen el pH de formulaciones liofilizadas durante el proceso de liofilización y después de la reconstitución. En general, los excipientes se pueden elegir sobre la base de los mecanismos por los que estabilizan las proteínas contra varios estreses químicos y físicos.

[00102] Como se describe en la presente, ciertos excipientes son beneficiosos para incluir a fin de aliviar los efectos de un estrés específico o regular una susceptibilidad particular de un polipéptido específico. Otros excipientes son beneficiosos para incluir porque tienen efectos más generales sobre la estabilidad física y covalente de las proteínas. Los excipientes particularmente útiles incluyen aquellos química y funcionalmente inocuos o compatibles con las soluciones tampón acuosas y los polipéptidos para optimizar las propiedades de estabilidad de una formulación. Varios de estos excipientes se describen en la presente como excipientes ilustrativos que exhiben compatibilidad química con las formulaciones acuosas de la invención y la compatibilidad funcional con el polipéptido incluido en tales formulaciones. Los expertos en la técnica entenderán que las enseñanzas y lineamientos proporcionados en la presente con respecto a los excipientes ejemplificados son igualmente aplicables a la utilización de una amplia variedad de otros excipientes bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los excipientes óptimos elegidos para

mejorar o conferir estabilidad de un polipéptido dentro de una formulación incluyen aquellos que están sustancialmente libres de reaccionar con grupos funcionales en el polipéptido. En este sentido, se pueden usar azúcares reductores y no reductores como un excipiente en una formulación de la invención. Sin embargo, debido a que los azúcares reductores contienen un grupo hemiacetal que pueden reaccionar y aductos forma u otras modificaciones con grupos amino en las cadenas laterales de aminoácidos de los polipéptidos (es decir, glicosilación). Del mismo modo, excipientes tales como citrato, succinato o histidina también pueden formar aductos con las cadenas laterales de los aminoácidos. Dadas las enseñanzas y la orientación proporcionada en la presente, los expertos en la técnica sabrán que se puede obtener una mayor retención de la estabilidad de un polipéptido dado puede lograrse mediante la elección de un azúcar no reductor respecto de un azúcar reductor o respecto de otros excipientes reactivos al aminoácido tal como los ejemplificados anteriormente. Los excipientes óptimos también se eligen para mejorar o proporcionar estabilización con referencia al modo de administración de una formulación acuosa de la invención. Por ejemplo, las vías parenterales de administración intravenosa (IV), subcutánea (SC) o intramuscular (IM) puede ser segura y eficaz cuando todos los componentes de la formulación mantienen la estabilidad física y química durante la fabricación, almacenamiento y administración. Los expertos en la técnica sabrán emplear uno o más excipientes que mantienen la estabilidad máxima de la forma activa de un polipéptido dado, por ejemplo, una condición de fabricación o almacenamiento particular o un modo de administración particular. Los excipientes ejemplificados en la presente para su uso en una formulación exhiben estas y otras características.

[00103] La cantidad o concentración de excipiente para usar en una formulación de la invención variará de acuerdo con, por ejemplo, la cantidad de polipéptido incluida en la formulación, la cantidad de otros excipientes incluidos en la formulación deseada, si se desea o necesita un diluyente, la cantidad o el volumen de otros componentes de la formulación, la cantidad total de los componentes dentro de una formulación, la actividad específica del polipéptido y la tonicidad u osmolaridad deseada se deben obtener. Ejemplos específicos para las concentraciones de excipientes se ejemplifican más adelante. Además, diferentes tipos de excipientes se pueden combinar en una formulación. De acuerdo con ello, una formulación de la invención puede contener un excipiente, dos, tres o cuatro o más tipos diferentes de excipientes. Las combinaciones de excipientes pueden ser particularmente útiles en conjunción con una formulación que contiene dos o más polipéptidos diferentes. Los excipientes pueden exhibir propiedades químicas similares o diferentes. Dadas las enseñanzas y la orientación proporcionada

en la presente, los expertos en la técnica sabrán qué cantidad o rango de excipiente se puede incluir en cualquier formulación particular para lograr una formulación de la invención que promueva la retención de la estabilidad del polipéptido. Por ejemplo, la cantidad y tipo de sal para incluir en una formulación de la invención se pueden seleccionar sobre la base de la osmolaridad deseada (es decir, isotónica, hipotónica o hipertónica) de la solución final, así como las cantidades y la osmolaridad de otros componentes para incluir en la formulación. Del mismo modo, mediante la ejemplificación con referencia al tipo de poliol o azúcar incluido en una formulación, la cantidad de tal excipiente dependerá de su osmolaridad. La inclusión de aproximadamente 5% de sorbitol puede alcanzar la isotonicidad, mientras que se necesita aproximadamente el 9% de un excipiente de sacarosa para lograr la isotonicidad. La selección de la cantidad o rango de concentraciones de uno o más excipientes que se pueden incluir dentro de una formulación de la invención se ha ejemplificado anteriormente con referencia a sales, polioles y azúcares. Sin embargo, los expertos en la técnica entenderán que las consideraciones descritas en la presente y ejemplificadas adicionalmente por referencia a los excipientes específicos son igualmente aplicables a todos los tipos y combinaciones de excipientes, incluyendo, por ejemplo, sales, aminoácidos, otros agentes de tonicidad, tensioactivos, estabilizadores, agentes de carga, crioprotectores, lioprotectores, antioxidantes, iones metálicos, agentes quelantes y/o conservantes.

[00104] Los excipientes se pueden incluir en una formulación de la invención en rangos de concentración generalmente entre aproximadamente 1–40% (p/v), entre aproximadamente 5–35% (p/v), entre aproximadamente 8–30% (p/v), entre aproximadamente 8–25% (p/v) o aproximadamente 8% (p/v). Las concentraciones tan altas como aproximadamente 45% (p/v), 50% (p/v) o más de 50% (p/v) en ciertos casos también se pueden emplear en las formulaciones de la invención. Por ejemplo, en algunos casos, puede ser conveniente incluir concentraciones hasta 60% (p/v) o 75% (p/v) para producir una formulación hipertónica de la invención. Tales soluciones hipertónicas se pueden diluir para producir una formulación isotónica antes de usar, si se desea. Otros rangos de concentración útiles incluyen entre aproximadamente 1–20%, particularmente entre aproximadamente 2–18% (p/v), más particularmente entre aproximadamente 4–16% (p/v), aun más particularmente entre aproximadamente 6–14% (p/v) o entre aproximadamente 8–12% (p/v) o aproximadamente 10% (p/v). Las concentraciones de excipiente y/o cantidades menores de, mayores de intermedias entre estos rangos también se pueden usar en una formulación de la invención. Por ejemplo, se puede incluir uno o más excipientes en una formulación que constituye menos de aproximadamente 1% (p/v). De modo similar, una

formulación puede contener una concentración de uno o más excipientes mayores de aproximadamente 40% (p/v). Por consiguiente, se puede producir una formulación de la invención que contiene cualquier concentración o cantidad deseada de uno o más excipientes que incluyen, por ejemplo, 1–30, 5–20, 5–10, 10–20, 15–20, 1–5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20% (p/v) o más, inclusive.

[00105] Un componente tampón de una formulación de la invención puede incluir uno o más excipientes. Como se describió anteriormente, un rol de un excipiente incluido es proporcionar la estabilización del polipéptido contra el estrés que se puede producir durante la fabricación, envío y almacenamiento. Para llevar a cabo este papel, al menos un excipiente puede funcionar como un tampón, estabilizador, agente de tonicidad, agente de carga, agente tensioactivo, crioprotector, lioprotector, antioxidante, fuente de iones metálicos, agente quelante y/o conservante. Además, al menos un excipiente también puede funcionar como un diluyente y/o vehículo o emplearse para reducir la viscosidad en formulaciones de alta concentración con el fin de permitir su liberación y/o mejorar la comodidad del paciente. Del mismo modo, al menos un excipiente, además, puede conferir más de una de las funciones anteriores en una formulación de la invención. Alternativamente, se pueden incluir dos o más excipientes en una formulación de la invención para llevar a cabo más de una de las funciones anteriores u otras. Por ejemplo, un excipiente se puede incluir como un componente en una formulación de la invención para cambiar, ajustar u optimizar la osmolaridad de la formulación, de este modo actúa como un tonificador. Del mismo modo, un agente de tonicidad y un agente tensioactivo se pueden incluir en una formulación de la invención para ajustar la osmolaridad y controlar la agregación. Los excipientes, su uso, formulación y características son bien conocidos en la técnica y se pueden encontrar descriptos en, por ejemplo, Wang W., *Int. J. Pharm.* 185:129–88 (1999) y Wang W., *Int. J. Pharm.* 203:1–60 (2000).

[00106] Los agentes de tonicidad y/o estabilizadores incluidos en formulaciones líquidas se pueden utilizar, por ejemplo, para proporcionar isotonicidad, hipotonía o hipertonicidad a una formulación tal que es adecuada para la administración. Tales excipientes también se pueden usar, por ejemplo, para facilitar el mantenimiento de la estructura de los polipéptidos y/o minimizar las interacciones electrostáticas de la solución de proteína–proteína. Los ejemplos específicos de agentes de tonicidad y/o estabilizadores incluyen polioles, sales y/o aminoácidos. Los agentes de tonicidad y/o estabilizadores incluidos en formulaciones liofilizadas se pueden utilizar, por ejemplo, como un crioprotector para proteger los polipéptidos del estrés por congelación o como

un lioprotector para estabilizar polipéptidos en el estado liofilizado. Los ejemplos específicos de tales crio y lioprotectores incluyen polioles, azúcares y polímeros.

[00107] Como se usa en la presente, el término "tensioactivo" se entiende que significa una sustancia que funciona para reducir la tensión superficial de un líquido en el que se disuelve. Los tensioactivos se pueden incluir en una formulación para una variedad de propósitos, que incluye, por ejemplo, prevenir o controlar la agregación, formación de partículas y/o adsorción superficial en formulaciones líquidas o prevenir o controlar estos fenómenos durante el proceso de liofilización y/o reconstitución en formulaciones liofilizadas. Los tensioactivos incluyen, por ejemplo, compuestos orgánicos anfipáticos que exhiben solubilidad parcial en ambos solventes orgánicos y soluciones acuosas. Las características generales de tensioactivos incluyen su capacidad para reducir la tensión superficial del agua, reducir la tensión interfacial entre el aceite y el agua y también formar micelas. Los tensioactivos de la invención incluyen tensioactivos no iónicos e iónicos. Los tensioactivos son bien conocidos en la técnica y se pueden encontrar descritos, por ejemplo, Randolph T. W. y Jones L. S., *Surfactant–protein interactions*. *Pharm Biotechnol.* 13:159–75 (2002). Brevemente, los tensioactivos no iónicos incluyen, por ejemplo, alquil poli(óxido de etileno), alquil poliglucósidos tales como glucósido de octilo y maltósido de decilo, alcoholes grasos tales como alcohol cetílico y alcohol oleílico, cocamida MEA, cocamida DEA, y cocamida TEA. Los ejemplos específicos de tensioactivos no iónicos incluyen los polisorbatos que incluyen, por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 28, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 65, polisorbato 80, polisorbato 81, polisorbato 85 y similares; los poloxámeros que incluyen, por ejemplo, poloxámero 188, también conocidos como poloxalkol o poli (óxido de etileno) –poli (óxido de propileno), poloxámero 407 o polietilen–polipropilenglicol y similares, y polietilenglicol (PEG). El polisorbato 20 es sinónimo de TWEEN 20, monolaurato de sorbitano y monolaurato de polioxietilensorbitano.

[00108] Los tensioactivos óptimos para incluir en una formulación de la invención se pueden elegir, por ejemplo, para mejorar o promover la retención en la estabilidad del polipéptido mediante la prevención o reducción de la agregación y/o adsorción. Por ejemplo, los ésteres de ácidos grasos de sorbitano tales como los polisorbatos son los tensioactivos que presentan con una amplia gama de características hidrofílicas y emulsionantes. Se pueden usar individualmente o en combinación con otros tensioactivos para cubrir una amplia variedad de necesidades de estabilización. Tales características son especialmente adecuadas para usar con polipéptidos, ya que se pueden adaptar para cubrir el amplio rango de características hidrofóbicas e hidrofílicas de

polipéptidos. Las consideraciones para seleccionar un agente tensioactivo incluyen las descritas con referencia a excipientes en general, así como el carácter hidrofóbico y la concentración micelar crítica del agente tensioactivo. Los tensioactivos ejemplificados en la presente, así como muchos otros bien conocidos en la técnica se pueden usar en una formulación de la invención.

[00109] Los rangos de concentración del tensioactivo para una formulación de la invención incluyen los descriptos previamente con referencia a los excipientes en general, las concentraciones particularmente útiles son menores de aproximadamente 1% (p/v). En este aspecto, las concentraciones de tensioactivo generalmente se pueden usar en rangos entre aproximadamente 0,0001–0,10% (p/v), particularmente entre aproximadamente 0,002–0,05% (p/v), más particularmente entre aproximadamente 0,003–0,01% (p/v), aun más particularmente entre aproximadamente 0,004–0,008% (p/v) o entre aproximadamente 0,005–0,006% (p/v). Las Concentraciones y/o cantidades de tensioactivo menores de, mayores de o intermedias entre estos rangos también se pueden usar en una formulación de la invención. Por ejemplo, se puede incluir uno o más tensioactivos en una formulación que constituye menos de aproximadamente 0,001% (p/v). De modo similar, una formulación puede contener una concentración de uno o más tensioactivos mayor de aproximadamente 0,10% (p/v). Por consiguiente, se puede producir una formulación de la invención que contiene esencialmente cualquier concentración o cantidad deseada de uno o más tensioactivos que incluyen, por ejemplo, 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,006, 0,007, 0,008, 0,009, 0,010, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09 o 0,10% (p/v) o más, inclusive. Se han descrito previamente varios tensioactivos útiles como un excipiente en una formulación de la invención. Otros tensioactivos útiles, ya sea en una formulación líquida o liofilizada de la invención incluyen, por ejemplo, ésteres de azúcares tales como ésteres de ácido láurico (C12), ácido palmítico (C16), ácido esteárico (C18), macrogol cetostearyl éter, macrogol lauril éter, macrogol oleil éter, oleato de macrogol, estearato de macrogol, macrogol ricinoleato de glicerol, macrogol hidroxistearato de glicerol; poliglucósidos de alquilo tales como glucósido de octilo y maltósido de decilo; alcoholes grasos tales como alcohol cetílico y alcohol oleílico, y cocamidas tales como cocamida MEA, DEA, TEA, otros tensioactivos no iónicos y otros tensioactivos iónicos.

[00110] La estabilidad de una formulación de la invención, que incluye una formulación líquida de la invención, se refiere a la retención de la estructura y/o función de un polipéptido dentro de una formulación. Un polipéptido en una formulación de la invención exhibirá atributos

tales como la resistencia al cambio o deterioro que afectan la estabilidad o función y por lo tanto mantiene las características funcionales constantes en el tiempo.

[00111] Un componente tampón de una formulación de la invención también pueden incluir uno o más tensioactivos como un excipiente. Como se ha descrito anteriormente, una función de los tensioactivos en una formulación de la invención es prevenir o minimizar la agregación y/o adsorción tales como la degradación inducida en superficie. A concentraciones suficientes, en general a aproximadamente la concentración micelar crítica del agente tensioactivo, una capa superficial de moléculas de tensioactivo sirve para impedir la adsorción de moléculas de proteína en la interfaz. De esta manera, se minimiza la degradación inducida en superficie. El tensioactivo, su uso, formulación y características para formulaciones son bien conocidos en la técnica y se pueden encontrar descriptas, por ejemplo, en Randolph y Jones, *supra*, (2002).

[00112] En otra forma de realización, la estabilidad de un polipéptido dentro de una formulación de la invención incluye, por ejemplo, la retención de la estabilidad física y/o química. La estabilidad del polipéptido se puede evaluar mediante, por ejemplo, la determinación de si el polipéptido se ha sometido a una vía de degradación física y/o química tal como que se describió previamente, que incluye la modificación química de su estructura. La retención de la estabilidad de un polipéptido en una formulación de la invención incluye, por ejemplo, la retención de estabilidad física o química entre aproximadamente 80–100%, 85–99%, 90–98%, 92–96% o 94–95% en comparación con la estabilidad del polipéptido en un punto de tiempo inicial o con respecto a un control idéntico mantenido a una temperatura más baja, por ejemplo, –70 grados Celsius. Por consiguiente, la estabilidad de un polipéptido dentro de una formulación de la invención incluye una retención de estabilidad mayor de 99,5%, al menos aproximadamente 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81% o 80% en comparación con la estabilidad del polipéptido en un punto de tiempo inicial con respecto a un control idéntico mantenido a una temperatura más baja, por ejemplo, –70 grados Celsius, inclusive.

[00113] En una forma de realización adicional, la estabilidad de un polipéptido dentro de una formulación de la invención incluye, por ejemplo, la retención de actividad. La actividad del polipéptido se puede evaluar usando, por ejemplo, un ensayo *in vitro*, *in vivo* y/o *in situ* indicativo de la función del polipéptido. La retención de estabilidad de un polipéptido en una formulación de la invención incluye, por ejemplo, la retención de actividad entre aproximadamente 50–100% o más, de acuerdo con la variabilidad del ensayo. Por ejemplo, la retención de la estabilidad puede

incluir la retención de actividad entre aproximadamente 60–90% o 70–80% en comparación con la actividad del polipéptido en un punto de tiempo inicial. Por consiguiente, la estabilidad de un polipéptido dentro de una formulación de la invención incluye la retención de actividad de al menos aproximadamente 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% y puede incluir mediciones de actividad mayores de 100% tal como 105%, 110%, 115%, 120%, 125% o 150% o más en comparación con la actividad del polipéptido en un punto de tiempo inicial, inclusive. Generalmente, se selecciona un punto de tiempo inicial que es el tiempo en que se prepara primero un polipéptido en una formulación de la invención o primero se examina por calidad (es decir, cumple las especificaciones de liberación). Un punto de tiempo inicial también puede incluir el tiempo en que se reformula un polipéptido en una formulación de la invención. La reformulación, por ejemplo, puede ser una concentración más alta, concentración más baja o a la misma concentración de una preparación inicial.

[00114] Se puede preparar una formulación de la invención que sea isotónica con una solución o líquido de referencia (es decir, el suero sanguíneo). Una solución isotónica tiene una cantidad sustancialmente similar de soluto disuelto en esta en comparación con las cosas alrededor de ella de modo que sea osmóticamente estable. A menos que se compare expresamente con una solución o fluido específico, isotónico o isotonicidad se usa de modo ilustrativo en la presente con referencia al suero sanguíneo humano (por ejemplo, 300 mOsmol/kg). Por lo tanto, una formulación isotónica de la invención contendrá una concentración sustancialmente similar de los solutos o exhibirá presión osmótica sustancialmente similar a la sangre humana. En general, una solución isotónica contiene aproximadamente la misma concentración de solutos como solución salina normal para los seres humanos y muchos otros mamíferos, que es aproximadamente 0,9 por ciento en peso (0,009 g/ml) de sal en solución acuosa (por ejemplo, 0,009 g/ml de NaCl). Las formulaciones de la invención también pueden incluir preparaciones de soluciones hipotónicas o hipertónicas.

[00115] La composición farmacéutica óptima será determinada por un experto en la técnica de acuerdo con, por ejemplo, la vía de administración deseada, el formato de administración, y la dosis deseada. Ver, por ejemplo, Pharmaceutical Sciences de Remington, supra. Tales composiciones pueden influir en el estado físico, estabilidad, velocidad de liberación in vivo, y velocidad de depuración in vivo del polipéptido. Por ejemplo, las composiciones adecuadas pueden ser agua para inyección, solución salina fisiológica para la administración parenteral. Los tensioactivos iónicos incluyen, por ejemplo, tensioactivos aniónicos, catiónicos y zwitteriónicos.

Los tensioactivos aniónicos incluyen, por ejemplo, tensioactivos a base de sulfonato o base de carboxilato, tales como jabones, sales de ácidos grasos, dodecilsulfato de sodio (SDS), laurilsulfato de amonio y otras sales de sulfato de alquilo. Los tensioactivos catiónicos incluyen, por ejemplo, tensioactivos a base de amonio cuaternario tales como bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB), otras sales de alquiltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio, amina de sebo polietoxilada (POEA) y cloruro de benzalconio. Los tensioactivos zwitteriónicos o anfóteros incluyen, por ejemplo, dodecilbetaína, óxido de dodecildimetilamina, cocamidopropilbetaína y cocoanfoglucinato.

[00116] El vehículo o portador primario en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o portador adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente suplementado con otros materiales comunes en las composiciones para administración parenteral. La solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina sérica también son ejemplos de vehículos. Otros ejemplos de composiciones farmacéuticas comprenden tampones Tris, o tampones de acetato, que pueden incluir además sorbitol o un sustituto adecuado de este. En una forma de realización, las composiciones se pueden preparar para almacenamiento mediante la mezcla de la composición seleccionada que tiene el grado deseado de pureza con agentes de formulación opcionales (Remington Pharmaceutical Sciences, supra) en la forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, la composición terapéutica se puede formular como un liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

[00117] Las formulaciones se pueden administrar en una variedad de métodos, por ejemplo, por terapia de inhalación, por vía oral, o por inyección. Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas pueden estar en la forma de una solución acuosa aceptable para uso parenteral libre de pirógenos que comprende el polipéptido deseado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para inyección parenteral es agua destilada estéril en la que un polipéptido se formula como una solución estéril, isotónica, conservada adecuadamente. Otra preparación también puede involucrar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (ácido poliláctico, ácido poliglicólico), perlas, o liposomas que proporciona la liberación controlada o sostenida del producto que luego se puede administrar a través de una inyección de depósito. También se puede usar ácido hialurónico y esto puede tener el efecto de promover la duración sostenida en la circulación. Otros medios adecuados

para la introducción de la molécula deseada incluyen dispositivos de administración de fármacos implantables.

[00118] En otro aspecto, las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración inyectable se pueden formular en soluciones acuosas, con preferencia en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hanks, solución de Ringer, o solución salina fisiológicamente tamponada. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, o dextrano. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar como suspensiones de inyección oleosas apropiadas. Los solventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo, triglicéridos, o liposomas. Polímeros amino policatiónicos no lipídicos también se pueden usar para la administración. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados para aumentar la solubilidad de los compuestos y permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. En otra forma de realización, una composición farmacéutica se puede formular para inhalación. Las soluciones de inhalación también se pueden formular con un propelente para la administración en aerosol. En aún otra forma de realización, las soluciones se pueden nebulizar. La administración pulmonar se describe adicionalmente en la Solicitud PCT N.º PCT/US94/001875, que describe la administración pulmonar de proteínas modificadas químicamente.

[00119] En algunos aspectos, las proteínas se pueden formular como una solución acuosa estéril, que contiene 50–100, 60–80, 65–75, 60–70, 70–80, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, o 80 mg/mL de proteína, 1–30, 5–20, 5–10, 10–20, 15–20, 1–5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, o mayor de tampón de fosfato de potasio 20 mM, menor de 1–10, 5–10, 5, 5, 6, 7, 8, 8.8, 9, 10, o mayor de 10 % (p/v) sacarosa, y/o menor de 0,006, 0,006, o mayor de 0,006% (p/v) polisorbato 20 a pH 4–12, 5–6, 5–7, 6–7, 5, 6, 6.7, 7 u 8, inclusive. En algunos aspectos, una proteína se puede formular como una solución acuosa estéril, que contiene proteína, tampón de fosfato de potasio, sacarosa, y/o polisorbato 20. En algunos aspectos, una proteína se puede formular con tampón de fosfato de potasio, sacarosa, y/o polisorbato 20. En algunos aspectos, una proteína se puede formular para administración IV. En algunos aspectos, una proteína se puede formular a pH neutro. En algunos aspectos, una proteína se puede formular a un pH de aproximadamente 4–12, 5–6, 5–7, 6–7, 5, 6, 6.7, 7 u 8,

inclusive. En algunos aspectos, una proteína descrita en la presente se puede formular con un componente no natural tal como, por ejemplo, un excipiente no natural.

[00120] También se contempla que ciertas formulaciones se pueden administrar por vía oral. En una forma de realización, las moléculas que se administran de esta manera se pueden formular con o sin los portadores usados habitualmente en la composición de formas de dosis sólidas tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, una cápsula se puede diseñar para liberar la porción activa de la formulación en el punto del tracto gastrointestinal en que la biodisponibilidad es maximizada y la degradación presistémica minimizada. Se pueden incluir agentes adicionales para facilitar la absorción de la molécula terapéutica. También se pueden emplear diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes desintegrantes de comprimidos, y aglutinantes. Las composiciones farmacéuticas para administración oral también se pueden formular usando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosificaciones adecuadas para la administración oral. Tales portadores permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones, y similares, para la ingestión por el paciente.

[00121] Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener a través de la combinación de compuestos activos con excipiente sólido y procesamiento de la mezcla de gránulos resultante (opcionalmente, después de la molienda) para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Se pueden añadir auxiliares adecuados, si se desea. Los excipientes adecuados incluyen rellenos de hidratos de carbono o proteínas, tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, papa u otras plantas; celulosa, tal como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, o carboximetilcelulosa de sodio; gomas, que incluyen arábica y tragacanto; y proteínas, tales como gelatina y colágeno. Si se desea, se pueden añadir agentes desintegrantes o solubilizantes tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, y ácido algínico o una sal de este, tal como alginato de sodio.

[00122] Los núcleos de grageas se pueden usar en conjunto con recubrimientos adecuados, tales como soluciones de azúcar concentradas, que también pueden contener goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y solventes orgánicos o mezclas de solventes adecuados. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los recubrimientos de comprimidos o grageas para la identificación del producto o para caracterizar la cantidad de compuesto activo, es decir, la dosis.

[00123] Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral también incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como las cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un recubrimiento, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener ingredientes activos mezclados con rellenos o aglutinantes, tales como lactosa o almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, líquido, o polietilenglicol líquido con o sin estabilizadores.

[00124] Las composiciones farmacéuticas adicionales serán evidentes para los expertos en la técnica, que incluyen las formulaciones que involucran polipéptidos en formulaciones de administración sostenida o controlada. Las técnicas para formular una variedad de otros medios de administración sostenida o controlada, tales como portadores de liposomas, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de depósito, también son conocidas por los expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, PCT/US93/00829 que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la administración de composiciones farmacéuticas. Los ejemplos adicionales de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas (US 3.773.919, EP 58.481), copolímeros de ácido L–glutámico y gamma etil–L–glutamato (Sidman et al., *Biopolymers*, 22:547–556 (1983), poli (2–hidroxietil–metacrilato) (Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15:167–277, (1981); Langer et al., *Chem. Tech.*, 12:98–105(1982)), etilen acetato de vinilo (Langer et al, *supra*) o ácido poli–D (–)–3–hidroxibutírico (EP 133.988) . Las composiciones de liberación sostenida también incluyen liposomas, que pueden prepararse por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Eppstein *et al.*, *PNAS (USA)*, 82:3688 (1985); EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949.

[00125] La composición farmacéutica para usar en la administración in vivo típicamente debe ser estéril. Esto se puede lograr por filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando se liofiliza la composición, se puede llevar a cabo la esterilización usando este método ya sea antes o después de la liofilización y reconstitución. La composición para administración parenteral se puede almacenar en forma liofilizada o en solución. Además, las composiciones parenterales generalmente se colocan en un contenedor que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica.

[00126] Una vez que se ha formulado la composición farmacéutica, se puede almacenar en viales estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, o un polvo sólido, deshidratado o liofilizado. Tales formulaciones se pueden almacenar ya sea en una forma lista para usar o en una forma (por ejemplo, liofilizada) que requiere la reconstitución antes de la administración.

[00127] En una forma de realización específica, se proporcionan kits para producir una unidad de administración de la dosis. Los kits pueden contener cada uno un primer recipiente que tiene una proteína seca y un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. También se incluyen dentro del alcance de esta invención los kits que contienen jeringas precargadas individuales y de múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas de líquido y liojeringas).

[00128] Una cantidad efectiva de una composición farmacéutica para emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto y objetivo terapéutico. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosis apropiados para el tratamiento en consecuencia variarán, en parte, de acuerdo con la molécula administrada, la indicación para la que se está utilizando el polipéptido, la vía de administración, y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y condición del paciente (edad y salud general). Por consiguiente, el clínico puede titular la dosis y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosis típica puede variar de aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg o más, de acuerdo con los factores mencionados anteriormente. Las composiciones de polipéptido con preferencia se pueden inyectar o administrar por vía intravenosa (IV). Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada se pueden administrar cada tres a cuatro días, cada semana, o cada dos semanas de acuerdo con la media vida y la tasa de depuración de la formulación particular. La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos del polipéptido en la formulación usada. Típicamente, una composición se administra hasta que se alcance una dosis que logre el efecto deseado. Por tanto, la composición puede administrarse como una dosis, o como dosis múltiples (a la misma o diferentes concentraciones/dosis) con el tiempo, o como una infusión continua. El perfeccionamiento adicional de la dosis apropiada se hace rutinariamente. Las dosis apropiadas se pueden determinar a través del uso de datos de dosis–respuesta apropiados.

[00129] Las dosis para usar con las proteínas y los polipéptidos descritos en la presente can be 0,1–10, 0,1–5, 0,25–5, 0,25–3, 1–3, 0,1, 0,2, 0,25, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,75, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, o mayor de 5 mg/kg, inclusive. En algunos aspectos cada dosis se puede administrar cada menos de 1–10, 2–8, 2–5, 1–4, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o mayor de 8 semanas, inclusive. En algunos

aspectos cada dosis se puede administrar cada menos de 1–10, 2–8, 2–5, 1–4, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, inclusive. En algunos aspectos cada dosis se administra IV.

[00130] La vía de administración de la composición farmacéutica está de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo, por vía oral, a través de inyección por vía intravenosa, vías intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, intralesional, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, o intraperitoneal; así como medios intranasal, enteral, tópica, sublingual, uretral, vaginal, o rectal, por sistemas de liberación sostenida o por dispositivos de implantación. Cuando se desee, las composiciones se pueden administrar por inyección en bolo o continuamente mediante infusión, o mediante dispositivo de implantación. Alternativa o adicionalmente, la composición se puede administrar localmente por medio de la implantación de una membrana, esponja, u otro material apropiado sobre el que la molécula deseada se ha absorbido o encapsulado. Cuando se utiliza un dispositivo de implantación, el dispositivo puede ser implantado en cualquier tejido u órgano adecuado, y la administración de la molécula deseada puede ser mediante difusión, bolo de liberación programada o administración continua.

[00131] En algunos casos, los polipéptidos svActRIIB se pueden administrar mediante el implante de ciertas células que se han modificado genéticamente, usando métodos tales como los descritos en la presente, para expresar y secretar el polipéptido. Tales células pueden ser células animales o humanas, y pueden ser autólogas, heterólogas o xenogénicas. Opcionalmente, las células pueden ser inmortalizadas. Con el fin de disminuir la probabilidad de una respuesta inmunológica, las células pueden ser encapsuladas para evitar la infiltración de los tejidos circundantes. Los materiales de encapsulación son típicamente cápsulas biocompatibles, semipermeables o membranas poliméricas que permiten la liberación del producto polipeptídico pero impiden la destrucción de las células por el sistema inmune del paciente o por otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes.

[00132] También se prevé la terapia génica svActRIIB in vivo en la que una molécula de ácido nucleico que codifica svActRIIB, o un derivado de svActRIIB se introduce directamente en el sujeto. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica un svActRIIB se introduce en células blanco por medio de la inyección local de un constructo de ácido nucleico con o sin un vector de administración apropiado, tal como un vector del virus adenoasociado. Los vectores virales alternativos incluyen, pero sin limitación, retrovirus, adenovirus, herpes simplex, virus y vectores del virus del papiloma. La transferencia física del vector de virus se puede obtener in vivo

mediante la inyección local del constructo de ácido nucleico deseado u otro vector de administración apropiado que contiene la secuencia de ácido nucleico deseada, transferencia mediada por liposomas, inyección directa (ADN desnudo), o bombardeo de micropartículas (pistola génica).

[00133] Las composiciones de la presente descripción se pueden usar solas o en combinación con otros agentes terapéuticos, por ejemplo, para aumentar sus efectos terapéuticos o disminuir los potenciales efectos secundarios. En algunos aspectos, se puede administrar doxorrubicina en una combinación. En algunos aspectos, la doxorrubicina es doxorrubicina liposomal. En algunos aspectos, la doxorrubicina se administra a razón de 40 mg/m². En algunos aspectos, la doxorrubicina se administra a 5–200, 10–150, 25–100, 30–50, 35–45, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, o 150 mg/m², inclusive.

[00134] Una formulación de la invención también puede incluir las combinaciones de polipéptidos en la formulación. Por ejemplo, una formulación de la invención puede incluir un polipéptido para el tratamiento de una o más afecciones. Una formulación de la invención también puede incluir dos o más polipéptidos diferentes. El uso de múltiples polipéptidos es una formulación de la invención que se puede dirigir a, por ejemplo, indicaciones iguales o diferentes. De modo similar, se pueden usar múltiples polipéptidos en una formulación de la invención para tratar, por ejemplo, tanto una condición patológica y uno o más efectos secundarios causados por el tratamiento primario. También se pueden incluir múltiples polipéptidos en una formulación de la invención para llevar a cabo diferentes propósitos médicos, que incluyen, por ejemplo, tratamiento y seguimiento simultáneo de la progresión de la condición patológica. Múltiples terapias concurrentes, tales como las ejemplificadas anteriormente, así como otras combinaciones bien conocidas en la técnica son particularmente útiles para el cumplimiento del paciente debido a que una formulación puede ser suficiente para algunos o todos los tratamientos sugeridos y/o diagnóstico. Los expertos en la técnica conocerán los polipéptidos que se pueden mezclar para una amplia variedad de terapias de combinación. Del mismo modo, una formulación de la invención también se puede utilizar con productos farmacéuticos de molécula pequeña y combinaciones de uno o más polipéptidos junto con uno o más productos farmacéuticos de molécula pequeña. Por lo tanto, la invención proporciona una formulación de la invención que contiene 1–10, 2–5, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 o más polipéptidos diferentes, así como para uno o más polipéptidos combinados con uno o más productos farmacéuticos de molécula pequeña.

[00135] Una formulación de la invención también pueden incluir uno o más conservantes y/o aditivos bien conocidos en la técnica. Del mismo modo, una formulación de la invención además se puede formular en cualquiera de las diversas formulaciones de administración conocidas. Por ejemplo, una formulación de la invención puede incluir agentes lubricantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes conservantes tales como metil- y propilhidroxi-benzoatos, agentes edulcorantes y agentes aromatizantes. Tales componentes opcionales, sus características químicas y funcionales son bien conocidos en la técnica. De modo similar se conocen en la técnica formulaciones que facilitan la liberación rápida, sostenida o retardada del polipéptido después de la administración. Una formulación de la invención se puede producir para incluir estos u otros componentes de la formulación bien conocidos en la técnica.

[00136] Una formulación de la invención también se puede producir, por ejemplo, en estados diferentes de un líquido acuoso. Por ejemplo, como una formulación liofilizada. Una formulación liofilizada contendrá generalmente, por ejemplo, un agente de carga o aglomerante y un estabilizador amorfo.

[00137] Una vez que se prepara una formulación de la invención como se describe en la presente, la estabilidad de los uno o más polipéptidos contenidos dentro de la formulación se puede evaluar usando métodos bien conocidos en la técnica. Varios de estos métodos se ejemplifican más adelante en los ejemplos e incluyen cromatografía de exclusión por tamaño y recuento de partículas. Cualquiera de una variedad de ensayos funcionales que incluyen, por ejemplo, actividad de unión, se puede evaluar otra actividad bioquímica y/o actividad fisiológica en dos o más puntos de tiempo diferentes para determinar la estabilidad del polipéptido en la formulación tamponada de la invención.

[00138] Una formulación de la invención, en general, se preparará de acuerdo con los estándares farmacéuticos y usando reactivos de grado farmacéutico. Del mismo modo, una formulación de la invención, en general, se puede preparar usando reactivos estériles en un ambiente de fabricación estéril o esterilizar después de la preparación. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar usando procedimientos bien conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, mediante la incorporación de uno o más polipéptidos en la cantidad requerida en un ácido acético, ácido glutámico o tampón de ácido succínico o excipiente de la invención con uno o una combinación de componentes de la formulación descriptos en la presente seguido por microfiltración de esterilización. En la forma de realización específica de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación particularmente

útiles incluyen, por ejemplo, secado al vacío y secado por congelación (liofilización) como se describió previamente. Tales métodos de secado producirán un polvo del uno o más polipéptidos junto con cualquier componente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada estéril de este.

Kits

[00139] También se describen en la presente kits que comprenden un vial que comprende una proteína descrita en el presente documento e instrucciones para usar. La proteína puede estar en cualquier composición farmacéutica adecuada tal como se describe en la presente, por ejemplo, una suspensión líquida adecuada para infusión IV. Alternativamente, la proteína puede estar en un estado liofilizado adecuado para re-suspensión antes de usar. Las instrucciones de uso pueden incluir las instrucciones de almacenamiento, selección de pacientes, dosis, métodos de administración, períodos de tiempo de uso, criterios de valoración clínicos, y similares. En algunos aspectos, las instrucciones incluyen instrucciones para llevar a cabo un método descrito en la presente.

[00140] Cabe señalar que, como se usa en la memoria descriptiva las reivindicaciones adjuntas, las formas incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

EJEMPLOS

[00141] Más abajo se encuentran ejemplos de formas de realización específicas. Los ejemplos se presentan a fines ilustrativos solamente y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera. Se han realizado esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero debería aceptarse, por supuesto, algún error experimental y alguna desviación.

[00142] La práctica de la presente invención puede emplear, a menos que se indique de otra manera, métodos convencionales de química de las proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinantes y farmacología, dentro del arte. Tales técnicas han sido explicadas completamente en la literatura. Ver, por ejemplo, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., edición actual); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2da. Edición, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18va. Edición (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company,

1990); Carey y Sundberg *Advanced Organic Chemistry 3^{ra} Ed.* (Plenum Press) Volúmenes A y B (1992).

Ejemplo 1: Expresión y purificación de STM 434.

[00143] Proceso de cultivo celular

[00144] La sustancia del fármaco STM 434 se expresó por una línea celular de ovario de hámster chino CS9 libre de suero. La secuencia de STM 434 se muestra en la SEQ ID NO:10, donde STM 434 es un homodímero de la secuencia presentada en la SEQ ID NO:10.

[00145] La creación del Banco Maestro de Células (MCB) que expresa STM 434 se denominó AMG 434 MCB. La expansión de la siembra y la producción del cultivo celular utiliza medios químicamente definidos sin materiales crudos derivados de animales. Los detalles del proceso de cultivo celular, incluyendo los controles del proceso, se describen más abajo, con una ilustración gráfica del proceso en la Figura 1. Algunos parámetros incluyen la concentración del producto determinada por HPLC de la proteína A, Q-PCR para la detección de ADN de MMV contaminante, endotoxina bacteriana, micoplasma, virus adventicio, y recuento microbiano aeróbico total. Además, se prepararon previamente dos lotes (Lotes 0010039909 y 0010039910), que fueron procesados adicionalmente por CMC Biologics a la sustancia del fármaco a granel formulada (Lotes 13–0066 y 13–0067).

[00146] Descongelamiento y expansión inicial (Etapas N–7 a N–4)

[00147] Se descongeló un vial de AMG 434 MCB, y el contenido fue transferido a un matraz agitador de 250 mL que contenía 59 ± 1 mL del medio de cultivo IMX 5,0, que contenía 300 nM de metotrexato (MTX) y 100 µg/L de factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF–1), precalentado a $36,0 \pm 1,0$ °C. El matraz agitador inoculado fue incubado luego a $36,0 \pm 1,0$ °C en una atmósfera de 5% CO₂ usando tapas venteadas y agitación entre 155 ± 5 revoluciones por minuto (rpm) durante 72 ± 12 horas. Después de analizar el cultivo celular, como se define en la Figura 1, una parte del cultivo celular fue inoculada en medio de cultivo precalentado en un matraz agitador de 500 mL a un volumen objetivo de 120 mL y una densidad objetivo de 4×10^5 células/mL. El matraz agitador fue incubado bajo las mismas condiciones que las indicadas más arriba durante 72 ± 12 horas. Después del análisis del cultivo celular, una parte del cultivo celular fue inoculada en un medio de cultivo precalentado en un matraz agitador de 1 L a un volumen objetivo de 240 mL y una densidad objetivo de 4×10^5 células/mL, y el matraz agitador fue incubado bajo las mismas condiciones que las indicadas más arriba durante 72 ± 12 horas.

[00148] Después del análisis del cultivo celular del matraz de 1 L, este cultivo celular se usó para inocular dos matraces agitadores de 2 L que contenían medio de cultivo precalentado, cada uno con un volumen objetivo de 600 mL y una densidad objetivo de 4×10^5 células/mL. Ambos matraces agitadores fueron incubados a $36,0 \pm 1,0$ °C en una atmósfera de 5% CO₂ usando tapas venteadas y agitación de 150–160 rpm durante 72 ± 12 horas. Cuando la incubación de los matraces de 2 L se completó, se analizaron muestras de cada matraz (Figura 1), después de lo cual se combinaron los contenidos de los dos matraces. La densidad celular del pool combinado se midió, y el pool se inoculó luego en un medio de cultivo precalentado en un recipiente de transferencia de vidrio de 10 L a un objetivo de 5 L y una densidad objetivo de 4×10^5 células/mL. Este cultivo se mantuvo mezclando a 90 ± 5 rpm antes del paso siguiente del proceso, que se inicia menos de 90 minutos a partir del tiempo de pooling.

[00149] Tren de siembra intermedio (Etapas N–3 a N–1)

[00150] La etapa de tren de siembra intermedio N–3 se realizó en una bolsa de biorreactor Wave de 50 L (GE Healthcare). Después de inflar la bolsa Wave, el cultivo de células reunido de 5 L fue transferido a la bolsa. La incubación se inició bajo las condiciones indicadas en la Tabla 1. Las muestras se extrajeron diariamente y se analizaron como se describe en la Figura 1. El día 3, después de determinar la densidad de células viables y la viabilidad en porcentaje (mínimo de $1,6 \times 10^6$ células/mL y 90%, respectivamente), el medio de cultivo IMX 5,0 que contenía 300 nM MTX y 100 µg/L IGF–1 fue transferido a través de un filtro estéril Opticap XL03 (Millipore) a la bolsa Wave para lograr una densidad celular de 4×10^5 células/mL. El volumen de cultivo celular total después de esta alimentación del bolo era generalmente de 20–25 L. La incubación continuó bajo las mismas condiciones (Tabla 1) durante 3 días más, con un muestreo diaria para análisis como se describe en la Figura 1. Antes de la cosecha, se esperaba que la densidad celular viable y la viabilidad cumplieran con los criterios de no menos de $1,6 \times 10^6$ células/mL y 90%, respectivamente.

Tabla 1. Parámetros del proceso del biorreactor Wave de 50 L

Parámetro	Puntos de ajuste
Capacidad de la bolsa Wave	50 L
Volumen del cultivo celular	5 L
Temperatura	36,0 °C
Velocidad de Rocker	22 rpm
Ángulo de Rocker	7°
Cobertura con CO ₂	5% a 0,3 litros por minuto (LPM)

[00151] La segunda y la tercera etapas de tren de siembra intermedio (N–2 y N–1) se realizaron en biorreactores de 60 L y 300 L, respectivamente. Después de transferir $45,0 \pm 1,0$ L de medio de expansión (IMX 5,0 conteniendo $100 \mu\text{g/L}$ IGF–1 y sin MTX), el biorreactor fue ajustado a los parámetros descritos en la Tabla 2. El biorreactor fue inoculado luego con el volumen, dentro de un rango de $\pm 3\%$, del cultivo celular de la bolsa Wave final requerido para lograr una densidad celular de partida de 4×10^5 células/mL. El contenido del biorreactor de 60 L fue incubado durante 3 días de acuerdo con las condiciones descritas en la Tabla 2. Las muestras se tomaron diariamente para el análisis, como se describe en la Figura 1. Durante la incubación, se agregó automáticamente carbonato de sodio 1,0 M para controlar el pH. Antes de la cosecha, se esperaba que la densidad celular viable y la viabilidad cumplieran los criterios de no menos de $2,0 \times 10^6$ células/mL y 90%, respectivamente.

Tabla 2. Parámetros del proceso del biorreactor de 60 L

Parámetro	Punto de ajuste	Rango
Temperatura	36,0 °C	35,0–37,0 °C
Agitación	83 rpm	78–88 rpm
Presión	2,0 psig	1,0–3,0 psig
pH	7,00	6,90–7,10
Oxígeno disuelto (DO)	48,0 mmHg	28,0–220,0 mmHg

[00152] Una vez que se completó la incubación en el biorreactor de 60 L, se preparó un biorreactor de 300 L para inoculación transfiriendo $245,0 \pm 2,0$ L de medio de expansión en el biorreactor, y ajustándolo a los parámetros descritos en la Tabla 3. El biorreactor se inoculó luego con el volumen, dentro de un rango de $\pm 3\%$, del cultivo final del biorreactor de 60 L requerido para alcanzar una densidad celular de partida de 4×10^5 células/mL. El contenido del biorreactor de 200 L se incubó durante 3 días de acuerdo con las condiciones descritas en la Tabla 3. Se tomaron muestras diariamente para el análisis, como se describe en la Figura 1. Durante la incubación, se agregó automáticamente carbonato de sodio 1,0 M para controlar el pH. Antes de la cosecha, se esperaba que la densidad celular viable y la viabilidad cumplieran con los criterios de no menos de $2,3 \times 10^6$ células/mL y 90%, respectivamente.

Tabla 3. Parámetros del proceso del biorreactor de 300 L

Parámetro	Punto de ajuste	Rango
Temperatura	36,0 °C	35,0–37,0 °C
Agitación	80 rpm	75–85 rpm
Presión	2,0 psig	1,0–3,0 psig
pH	7,00	6,90–7,10
DO	48,0 mmHg	28,0–220,0 mmHg

[00153] Biorreactor de producción

[00154] El biorreactor de producción final en el procesamiento corriente arriba de STM 434 tiene una capacidad nominal de 2000 L. Para iniciar esta etapa de producción, el biorreactor se cargó con $1100,0 \pm 5,0$ L de medio de producción ABM025–004, un medio definido químicamente que incluye componentes comunes y cuya receta se encuentra en la Tabla 4. El biorreactor fue ajustado luego a los parámetros definidos en la Tabla 5 para prepararlo para la inoculación. El biorreactor fue inoculado luego con el volumen, dentro de un rango de $\pm 3\%$, del cultivo final del biorreactor de 300 L requerido para lograr una densidad celular de partida de 5×10^5 células/mL. El contenido del biorreactor de 2000 L se incubó durante 11 días de acuerdo con las condiciones descritas en la Tabla 5. Durante la incubación, se agregó automáticamente carbonato de sodio 1,0 M para controlar el pH. Los días 3, 6, y 8 de la corrida del biorreactor de producción, se realizaron alimentaciones de bolos de medio de producción AFM028–001 (Tabla 4) a 8% del cultivo inicial. Se agregó una solución al 1% de simeticona (en cantidades de 100 gramos) diariamente al biorreactor como un agente antiespumante. Se tomaron diariamente muestras para análisis, como se describe en la Figura 1, incluyendo muestras antes y después de la alimentación del bolo de AFM028–001. Si la concentración de glucosa caía por debajo de 4,0 g/L, se agregaba una solución al 50% de glucosa para llevar la concentración en el biorreactor a 8 g/L. El testeó en proceso para este paso del proceso se describe en la Tabla 13.

Tabla 4. Recetas del medio de producción del biorreactor

Medio de producción	Componente	Concentración
ABM0025–004 (pH objetivo: $6,9 \pm 0,1$)	WFI	C.S.
	ABM025 (medio común)	11,04 g/L
	ASM003 (medio común)	7,68 g/L
	L–Tirosina, disódica, dihidrato	1,15 g/L
	L–Glutamina	1,25 g/L
	Bicarbonato de sodio	1,2 g/L
	Cloruro de sodio	1,0 N/A
	Cloruro de potasio	1,0 g/L
	Dextrosa	5,5 g/L
	Tetraclorhidrato de espermina (100 mM)	100,0 μ L/L
	10 N Hidróxido de sodio	550,0 μ L/L
	6 N Ácido clorhídrico	Según se requiera
	IGF–1 (1 mg/mL) [agregado pre–filtración]	100,0 μ L/L
AFM028–001 (pH objetivo: $6,8 \pm 0,1$)	WFI	QS
	AFM023 (medio común)	11,1 g/L
	AFM028 (medio común)	74,0 g/L
	L–Tirosina, disódica, dihidrato	0,8 g/L
	Bicarbonato de sodio	1,2 g/L
	L–Glutamina	3,0 g/L
	10 N Hidróxido de sodio	4,0 mL/L
	6 N Ácido clorhídrico	Según se requiera

Tabla 5. Parámetros del proceso de producción del biorreactor de 2000 L

Parámetro	Punto de ajuste	Rango
Temperatura	36,5 °C	36,0–37,0 °C
Agitación	74 rpm	69–79 rpm
Presión	2,0 psig	1,0–3,0 psig
pH	7,05	7,0–7,1
DO	48,0 mmHg	28,0–220,0 mmHg

[00155] Clarificación y filtración de la cosecha de cultivo celular

[00156] Al final de la corrida del biorreactor de producción, después de haber realizado el muestreo, el biorreactor se enfrió a 10–15 °C, con la presión ajustada a 8,0–12,0 psig. Se colocó una línea de transferencia entre el biorreactor de 2000 L y una centrifugadora de pila de discos CSC–20 (Westfalia), junto con una línea de salida de la centrifugadora a un tanque de recolección centrado. El volumen de células empaquetadas del contenido del biorreactor se midió, y este valor se usó para determinar el valor del intervalo de inyección, que se incluyó en la programación de la centrifugadora, junto con otros parámetros como se muestra en la Figura 1. La línea entre el

biorreactor y la centrifugadora se abrió, y se inició la centrifugación. Una vez que se completó la centrifugación, el recipiente de la centrifugadora se enjuagó, y el producto se llevó al tanque de recolección centrado con una solución de 25 mM de Tris, 100 mM de cloruro de sodio, pH 7,4 (Tris–solución salina con tampón; TBS). Los parámetros operativos de la centrifugación se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros operativos de centrifugación de la cosecha

Parámetro	Punto de ajuste
Caudal	12 LPM
Contrapresión	75 psig
Masa de inyección objetivo	4,0 ± 1,0 kg
Velocidad	8400 rpm

[00157] Después de las operaciones de centrifugación, el pool de cosecha fue sometido a filtración de lecho profundo a través de series paralelas de 2 filtros. El primer filtro en cada tren era de Sartopore 2 cartucho Maxicap de 0,2 μm (Sartorius; área de membrana 1,2 m^2) para esterilizar la filtración de lecho profundo. El segundo filtro era una cápsula de Zeta Plus Maximizer 120ZA (Cuno; área de membrana 1,84 m^2) con el propósito de reducir los niveles de ácidos nucleicos. Después de enjuagar los filtros con TBS, el contenido del tanque de recolección de la fase central fue bombeado a través de los trenes de filtros a un tanque de recolección de filtrados de acuerdo con las condiciones mostradas en la Tabla 7. Una vez que la fase central se había transferido completamente, se agregaron 220 L de TBS al tanque de recolección de la fase central, después de lo cual se empujan 100 L a través de cada tren de filtros al tanque de recolección de filtrados. El proceso de filtración se completó empujando aire a través de cada tren de filtros, recogiendo el líquido en el tanque de recolección de filtrados. Al final de la filtración, el pool de filtrados se mezcló de manera que evita el espumado. El pool de filtrados se mantuvo a 2–8 °C durante no más de 72 horas, tomándose muestras para análisis de acuerdo con la Tabla 13.

Tabla 7. Parámetros operativos de la filtración de profundidad

Parámetro	Punto de ajuste
Caudal	$\leq 12,3$ LPM
Presión de entrada	≤ 30 psig
Presión diferencial filtro Sartopore	≤ 20 psig
Presión diferencial filtro Zeta Plus	≤ 20 psig
Agitación tanque de filtrados	Moderado; iniciado después que se recogieron 300 L
Presión diferencial durante el pasaje de aire	≤ 20 psig
Mezclado del pool de filtrados	Moderado; ≥ 20 minutos

[00158] Proceso de purificación

[00159] El proceso de purificación corriente abajo de STM 434 incluye tres pasos de cromatografía en columna, un paso de inactivación viral a bajo pH, un paso de filtración viral, y un paso de formulación final usando filtración de flujo tangencial. Todos los pasos en este proceso se realizaron a temperatura ambiente, excepto donde se indique específicamente de otra manera. La Figura 2 ilustra el proceso de purificación de STM 434. Para cada corrida de cultivo de células, se realizó una corrida del proceso de purificación. La formulación final de la sustancia del fármaco STM 434 era 10 mM de fosfato de potasio, 8,8% (p/v) de sacarosa, 0,006% (p/v) de polisorbato 20, pH 6,7, a una concentración de proteína objetivo de 70 mg/mL. El proceso de purificación incluye dos métodos ortogonales robustos para la depuración viral usando dos modelos de virus (xMuLV y MMV).

[00160] Cromatografía de la proteína A

[00161] La cromatografía de la proteína A se usó para capturar anticuerpos y proteínas de fusión Fc, tales como STM 434, a través de la afinidad de la proteína A por los dominios Fc. El proceso de purificación de STM 434 utiliza la resina de la proteína A MabSelect SuRe (GE Healthcare). El paso de purificación por afinidad de la proteína A proporciona una amplia reducción de las proteínas de las células huésped y ADN, además de virus potenciales. Los parámetros operativos para el paso de cromatografía de la proteína A se describen en la Tabla 8. Para las dos corridas de purificación de cGMP, se utilizó una columna con un volumen de resina de 39,3 L. En base a la densidad de carga de 20 g/L, el paso de la proteína A se corrió en ciclos, el número de ciclos y el volumen de la cosecha de cultivo celular clarificado cargada en cada ciclo se determinó por la masa total de STM 434 en la cosecha clarificada final de cada una de las dos corridas del biorreactor.

[00162] La columna de la proteína A se preparó para el procesamiento enjuagando con tampón de equilibrio (TBS). El primer bolo de la cosecha de cultivo celular clarificada se cargó en la columna, seguido por lavado de la columna con un mínimo de 80 L de tampón equilibrio. La columna se lavó luego con un mínimo de 160 L de 25 mM de Tris, 500 mM de cloruro de calcio, pH 7,5. Este paso se introdujo para proporcionar depuración adicional del ADN de la célula huésped. La columna se lavó luego con un mínimo de 120 L de tampón de equilibrio para remover cualquier cloruro de calcio residual. Luego se eluyó el STM 434 de la columna con 100 mM de acetato de sodio, pH 3,6. Los criterios de recolección, basados en la absorbancia del efluente de la columna, se proporcionan en la Tabla 8. El pool de elución se mantuvo en un tanque mantenido a 2–8 °C. Después del paso de elución, la columna se depuró con un mínimo de 120 L de 100 mM ácido fosfórico. Este ciclo se repitió hasta que toda la cosecha celular clarificada se consumió. Después que se completó el último ciclo, la columna se enjuagó con un mínimo de 40 L de tampón de equilibrio, seguido por un mínimo de 120 L de 300 mM hidróxido de sodio para regenerar la resina. La columna se almacenó entre corridas en 2% de alcohol bencílico, 50 mM de citrato, pH 5,0. Se recogieron múltiples muestras de esta operación unitaria como se describe en la Tabla 13.

Tabla 8. Parámetros operativos de cromatografía de proteína A

Parámetro	Punto de ajuste
Altura del lecho	25 ± 2 cm
Densidad de carga máxima	20,0 g de STM 434 por L de resina
Caudal	≤ 6,6 LPM (objetivo: 250 cm/h)

[00163] Inactivación viral a bajo pH

[00164] El pool de proteína A combinado se sometió a inactivación viral a través del uso de bajo pH. El pool se llevó a una temperatura de 20 ± 2 °C, después de lo cual se ajustó a pH 3,6 ± 0,1 mediante la adición lenta de 10% (v/v) de ácido acético. El pool titulado se mantuvo a bajo pH durante 60–90 minutos. Después del período inactivación, el pool se ajustó a pH 5,0 ± 0,1 mediante la adición lenta de 2,0 M de Tris base.

[00165] El pool de inactivación viral se pasó luego a través de un tren de filtros incluyendo tres diferentes tipos de filtros. El primer filtro era un Millistak + HC Pod (Millipore; área de membrana 1,1 m²), que remueve partículas que se pueden haber formado durante el tratamiento ácido. El segundo filtro en el tren era el Sartobind Q (Sartorius; área de membrana 1,98 m²), con tres cápsulas de 30 pulgadas dispuestas en paralelo. Este intercambiador de iones sirve para

reducir adicionalmente los ácidos nucleicos y otras impurezas cargadas negativamente. El filtro final era un Express SHC Opticap XL 10 cápsula de 0,5 µm/0,2 µm (Millipore; área de membrana 0,49 m²). El filtrado se realizó a un caudal no mayor que 6,6 L/minuto. El pool de inactivación viral filtrado (FVIP) se recogió en un tanque. Cuando el pool de inactivación viral pre-filtrado estaba cerca del fondo del recipiente que lo contenía, el resto se capturó con un mínimo de 40 L de acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 70 mM, pH 5,0 en el tanque de recolección de FVIP. Se recogieron múltiples muestras del FVIP de esta operación unitaria como se describe en la Tabla 13.

[00166] Para las primeras dos corridas de cGMP el FVIP, denominado intermediario de la sustancia del fármaco (DSI), se almacenó en bolsas estériles de 20 L Flexboy bags (Sartorius), y se mantuvo a –30 °C. Partes del primer lote de DSI (Lote #0010039909) fueron almacenadas en frascos de policarbonato y almacenadas a –30 °C, para servir como muestras de estabilidad para evaluar el impacto potencial del almacenamiento a largo plazo sobre la calidad del producto. Los resultados de los estudios de estabilidad de 24 y 35 meses indican que la calidad del DSI almacenado a –30 °C durante 35 meses se retuvo durante el período de almacenamiento, y que el DSI se pudo usar para evaluar la adecuación para el uso en la preparación de la sustancia del fármaco por cGMP a través del lote de Demo DS

[00167] Cromatografía de intercambio de cationes

[00168] El DSI de STM 434 fue procesado adicionalmente mediante el uso de cromatografía de intercambio de cationes (CEX); este paso se realizó en el modo de flujo a través usando la resina EMD Fractogel SO3 (Merck). Este paso fue desarrollado para la reducción del ADN de la célula huésped y proteínas, además de otras impurezas potenciales, y se demostró también que era capaz de aumentar el nivel de formas más altamente sialiladas de STM 434. Los parámetros operativos para el paso de CEX se describen en la Tabla 9. Para las dos corridas de purificación por cGMP, se utilizó una columna con una altura de resina empaquetada de 21,5 cm, correspondiente al volumen de columna de 33,6 L. En base al rango de densidad de carga de 75–125 g/L, el paso de CEX paso se corrió en un ciclo.

[00169] Antes de iniciar las operaciones de cromatografía, se descongeló estadísticamente el STM 434 DSI congelado a 2–8 °C durante 4–6 días, seguido por almacenamiento durante la noche a temperatura ambiente. La columna de CEX se preparó para el uso haciendo fluir primero un mínimo de tres volúmenes de columna (CVs) de acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 500 mM, pH 5,0, seguido por un mínimo de tres CVs de acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio

70 mM, pH 5,0. El STM 434 DSI descongelado se cargó luego en la columna. Para las dos corridas de purificación por cGMP, se cargaron volúmenes totales diferentes de STM 434 DSI en la columna de CEX, proviniendo cada lote de una corrida de proceso corriente arriba diferente. El volumen total de STM 434 DSI lote 0010039909 en la primera corrida era de 260,6 L (22 Flexboys), para una masa total de STM 434 de 2907 gramos. El volumen total de STM 434 DSI lote 0010039910 en la segunda corrida era de 294 L (25 Flexboys), para una masa total de STM 434 de 3376 gramos.

[00170] La recolección del eluato que contenía el producto se inició llevando el flujo de eluato hacia una bolsa de recolección estéril a través de un filtro estéril cuando la absorbancia de UV alcanza $0,50 \pm 0,1$ OD a 280 nm. Después de cargar todo el DSI en la columna, la columna de CEX se lavó luego con acetato de sodio 50 mM, pH 5,0. La recolección del eluato que contenía el producto (pool de CEX) continúa hasta que la absorbancia de UV alcanza $0,50 \pm 0,1$ OD a 280 nm. Un mínimo de tres CVs del tampón de lavado fluyeron hacia la columna antes de volver al acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 500 mM, pH 5,0 para depurar la columna, seguido por un mínimo de tres CVs de hidróxido de sodio 0,5 N para la sanitización de la columna, seguido por un mínimo de tres CVs de hidróxido de sodio 0,1 N para almacenamiento de la columna. El pool de CEX se muestreó asépticamente para un testeo en proceso como se describe en la Tabla 13, y se mantuvo durante la noche a temperatura ambiente.

Tabla 9. Parámetros operativos de la cromatografía de intercambio de cationes

Parámetro	Rangos objetivo
Altura del lecho	20 ± 2 cm
Densidad de carga	75–125 g STM 434 por L de resina
Caudal	$\leq 4,7$ LPM (objetivo: 250 cm/h)
pH precarga	pH 4,8–5,2 a 17–25 °C
Conductividad precarga	9–11 mS/cm

[00171] Cromatografía de interacción hidrofóbica

[00172] El pool de CEX de STM 434 se sometió a cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC); este paso se realizó en un modo de flujo a través usando la resina de fenil sefarosa “Phenyl Sepharose FF High Sub resin” (GE Healthcare). Este paso se desarrolló para la reducción de agregados del producto y otras impurezas potenciales del proceso. Los parámetros operativos para el paso de HIC se describen en la Tabla 10. Para las dos corridas de purificación por cGMP, se utilizó una columna con una altura de resina empaquetada de 27,0 cm, correspondiente a un

volumen de columna de 42,2 L. En base a la densidad de carga máxima de 50 g/L, se realizó el paso de HIC en dos ciclos para cada lote.

[00173] El pool de CEX se preparó para el paso de HIC acondicionando el pool con un tampón de dilución que consistía en sulfato de sodio 750 mM, acetato de sodio 250 mM, Tris base 69,5 mM, pH 10,5. La relación de acondicionamiento era de una parte de tampón de dilución por cuatro partes de pool de CEX. Mientras se mezclaba el pool de CEX acondicionado se equilibró la columna de HIC haciendo fluir un mínimo de tres CVs de sulfato de sodio 150 mM, acetato de sodio 50 mM, pH 5,5. Una vez que se alcanzaban el pH de partida y la conductividad del efluente de la columna, como se indicó en la Tabla 10, la mitad del pool de CEX acondicionado (carga de HIC) se cargó en la columna. La recolección del eluato que contenía el producto (pool de HIC) se inició llevando el flujo de eluato hacia la bolsa de recolección cuando la absorbancia de UV alcanza $0,2 \pm 0,1$ OD a 280 nm. Después de cargar toda la carga de HIC sobre la columna, la columna de HIC se lavó luego con sulfato de sodio 150 mM, acetato de sodio 50 mM, pH 5,5. La recolección del pool de HIC continuó hasta que la absorbancia de UV alcanza $1,50 \pm 0,1$ OD a 280 nm, cuando el efluente se llevó de nuevo a la recolección de residuos. Un mínimo de tres CVs del tampón de lavado se bombearon a través de la columna, seguido por un mínimo de tres CVs de hidróxido de sodio 0,5 N para depurar la columna. La columna se lavó luego con un mínimo de tres CVs de WFI para completar el primer ciclo. Durante los pasos de regeneración, el pool de HIC del primer ciclo se mezcló para asegurar homogeneidad y luego se transfirió a través de un filtro estéril a una bolsa de bioprocesamiento estéril.

[00174] Después de completar el lavado de la columna de WFI, se repitió el proceso de equilibrio de HIC, seguido por el procesamiento por HIC de la mitad restante de la carga de HIC como se describió más arriba. El pool de HIC del segundo ciclo se mezcló y luego se transfirió a través de un filtro estéril a la bolsa de bioprocesamiento que tenía el pool de HIC del primer ciclo. El pool de HIC combinado se mantuvo a temperatura ambiente para almacenamiento durante la noche. La columna de HIC se almacenó en hidróxido de sodio 0,1 N bombeando un mínimo de tres CVs a través de la columna después de la separación de la columna con hidróxido de sodio 0,5 N. Se recogieron múltiples muestras para el testeo en proceso como se describe en Tabla 13.

Tabla 10. Parámetros operativos de la cromatografía de interacción hidrofóbica

Parámetro	Rangos objetivo
Altura del lecho	25 ± 2 cm
Densidad de carga máxima	50 g de STM 434 por L de resina
Caudal	≤ 4,7 LPM
pH precarga	pH 5,4–5,6 a 17–25 °C
Conductividad precarga	23–27 mS/cm

[00175] Filtración viral

[00176] El pool de HIC combinado fue filtrado a través de un filtro Planova 20 N (Asahi Kasei Bioprocess; área de membrana 4,0 m²) como un paso de reducción viral ortogonal. Antes del procesamiento del pool que contenía el producto, el filtro fue testeado en cuanto a pérdidas con una presión de entrada de 13,5–14,0 psig. Después de pasar la prueba de pérdidas, se instaló una cápsula de 0,2 µm de Sartopore 2 (Sartorius; área de membrana 0,2 m²) corriente arriba del filtro viral, y este sistema fue equilibrado enjuagando con 40 kg ± 2 kg de sulfato de sodio 150 mM, acetato de sodio 50 mM, pH 5,5, de acuerdo con los parámetros indicados en la Tabla 11. Después del mezclado y muestreo, el pool de HIC combinado fue bombeado a través del filtro viral a una presión objetivo de 12 ± 2 psig. El filtrado viral se recogió a través de la conexión directa del tren de filtros a una bolsa de bioprocesamiento estéril. Una vez que se completó la filtración del pool de HIC combinado, el producto residual se capturó del filtro y de las líneas de transferencia con no menos de 16 kg de sulfato de sodio 150 mM, acetato de sodio 50 mM, pH 5,5. Después que se completó la corrida, el filtro de 0,2 es sometido a un testeo de integridad (usando una prueba de punto de burbuja), y el filtro viral fue enjuagado con un mínimo de 16 L de hidróxido de sodio 0,25 N, 0,5% (v/v) de Triton X–100, seguido por un mínimo de 32 L de WFI. Después de estos enjuagues, el filtro viral fue sometido a testeo con partículas de oro para asegurar la distribución de tamaños de poros, seguido por el testeo de pérdidas posuso. El filtrado viral se transfirió a una suite post–viral, que tiene la mayor presión positiva en la instalación y también una unidad de manipulación de aire dedicada sin aire recirculado, y se mantuvo a temperatura ambiente. Se recogieron muestras para el testeo en proceso, como se describe en la Tabla 13.

Tabla 11. Parámetros operativos de filtración viral

Parámetro	Punto de ajuste
Test de pérdidas pre-uso (Filtro viral)	13,5–14,0 psig
Presión operativa	12 ± 2 psig
Límite de carga del filtro	≤ 325 L/m ²
pH de equilibrio	pH 5,4–5,6 a 17–25 °C
Conductividad de equilibrio	23–27 mS/cm
Test de integridad posuso (filtro de 0,2 µm)	punto de burbuja WFI ≥ 46 psig
Test de pérdidas posuso (Filtro viral)	13,5–14,0 psig

[00177] Ultrafiltración/diafiltración por filtración de flujo tangencial

[00178] El filtrado viral de STM 434 fue sometido a ultrafiltración (UF) y diafiltración (DF) para lograr el intercambio de tampón y la concentración de la sustancia del fármaco a su formulación final a través del uso de filtración de flujo tangencial (TFF). Se usaron dos soluciones críticas para obtener la sustancia del fármaco a granel formulada. Estas soluciones eran: (1) fosfato de potasio 10 mM, 8,8% (p/v) de sacarosa, pH 6,7 y (2) 1% (p/v) de Tween–20 (polisorbato 20). Estas soluciones fueron preparadas sobre una base de como se requiera.

[00179] Para el paso TFF, se usaron cuatro membranas Pellicon 3 Ultracel TFF (Millipore; 10 kDa límite de peso molecular nominal; área de membrana cada uno 1,14 m²) para procesar la totalidad del filtrado viral en un ciclo, en base a una carga objetivo de 400 ± 50 g/m². Nuevas membranas fueron enjuagadas con WFI hasta que la conductividad del retentato bajó por debajo de su punto de ajuste, como se describe en la Tabla 12, seguido por enjuague con hidróxido de sodio 0,5 N hasta que el volumen de enjuague del permeato alcanza un mínimo de 40 L. Después el enjuague inicial de la membrana, y al comienzo del procesamiento de TFF con membranas usadas, la base se enjuagó del sistema con WFI hasta que las conductividades del retentato y del permeato estaban por debajo de su punto de ajuste (Tabla 12). Después que se realizó el testeó de la integridad del filtro (usando una prueba de permeabilidad de agua normalizado), se realizó la sanitización bombeando un mínimo de 40 L de hidróxido de sodio 0,5 N a través del sistema, manteniéndose la solución de sanitización en el sistema durante 1–24 horas. Después de la sanitización, el sistema de TFF se enjuagó nuevamente con WFI hasta que las conductividades del retentato y del permeato bajaron por debajo de su punto de ajuste (Tabla 12), junto con el volumen de enjuague del retentato que alcanzaba un mínimo de 40 L.

[00180] Para iniciar el procesamiento de filtrado viral de STM 434, el sistema se equilibró con fosfato de potasio 10 mM, 8,8% (p/v) de sacarosa, pH 6,7. El equilibrio se completó una vez que el pH del retentato y del permeato alcanza el rango objetivo de pH 6,5–6,9, con un volumen de

enjuague del permeato de no menos de 20 L. El filtrado viral se mezcló y se muestreó desde las partes superior e inferior del contenedor del retentato para medir la concentración de proteína, para asegurar el mezclado completo y que la relación entre proteína/área de superficie cumple con su objetivo (Tabla 12). Luego se inició la concentración de proteína por UF, ajustándose el caudal de alimentación para alcanzar una presión transmembrana de 20 ± 5 psig. Cuando se alcanzó el volumen del retentato que corresponde a una concentración de proteína de 60 g/L, el retentato mostró que las partes superior e inferior del contenedor del retentato que confirmaban la concentración de proteína. El retentato fue sometido luego a DF contra 10 diavolúmenes de fosfato de potasio 10 mM, 8,8% (p/v) sacarosa, pH 6,7. Después que se completó el DF, se volvió a utilizar la UF para llevar a la concentración del retentato a un objetivo de 105 g/L, en base al volumen de retentato que logra esta concentración. Después de drenar el lado del retentato del sistema TFF en el contenedor del retentato, el sistema fue enjuagado con 5 L de fosfato de potasio 10 mM, 8,8% (p/v) de sacarosa, pH 6,7, y el enjuague fue agregado al contenedor del retentato. Después de 10–15 minutos de mezclado, se toman muestras de las partes superior e inferior del retentato para la medición de la concentración de la proteína, para asegurar suficiente mezclado y concentración del producto durante el paso de DF. El retentato se diluyó adicionalmente con fosfato de potasio 10 mM, 8,8% (p/v) de sacarosa, pH 6,7 como sea necesario para llevar la concentración final a $70,0 \pm 3,5$ g/L. El pool de TFF final fue filtrado en forma estéril en una bolsa de bioprocesamiento a una formulación final y llenado a granel. Las muestras de retentado para el testeo en proceso se recogieron como se describe en la Tabla 13.

Tabla 12. Parámetros operativos de filtración de flujo tangencial

Parámetro	Punto de ajuste
Relación entre proteína/área superficial	$\leq 600 \text{ g/m}^2$ (objetivo: $400 \pm 50 \text{ g/m}^2$)
Presión transmembrana	15–25 psig
Caudal de alimentación	270 L por m^2 por hora (LMH)
Conductividad de retentato (enjuague inicial de WFI)	$\leq 1000 \text{ }\mu\text{S/cm}$
Conductividad del retentato y del permeato (enjuagues post-NaOH)	$\leq 1000 \text{ }\mu\text{S/cm}$
pH del permeato después del equilibrio	pH 6,5–6,9
Concentración objetivo en la primera etapa de ultrafiltración	60 g/L
Volumen de diafiltración	≥ 10 diavolúmenes
Concentración objetivo e la segunda etapa de ultrafiltración	105 g/L
Objetivo de la concentración (final)	$70,0 \pm 3,5 \text{ g/L}$

[00181] Formulación final y llenado con la sustancia del fármaco

[00182] La sustancia del fármaco STM 434 formulado final fue preparada y llenada después del paso de TFF. Un volumen suficiente de una solución al 1% (p/v) de polisorbato 20 se agrega al pool de TFF para dar una concentración final de polisorbato 20 de 0,006% $\pm$ 0,003% (p/v). Después de la adición del tensioactivo, la sustancia del fármaco a granel se mezcló durante 10–15 minutos. La campana de flujo de aire laminar en la sala de llenado se limpió, y se preparó el equipo de llenado, incluyendo la cápsula del filtro Opticap XL5 de 0,22 μ m (Millipore; área de membrana 0,35 m²). Antes de filtrar la sustancia del fármaco formulada final, el filtro se enjuagó con 30 $\pm$ 1 L de tampón de formulación de STM 434 (fosfato de potasio 10 mM, 8,8% [p/v] de sacarosa, 0,006% [p/v] de polisorbato 20, pH 6,7) para saturar la membrana con polisorbato 20 y evitar su remoción de la sustancia del fármaco formulada. Después del enjuague con el tampón de formulación, el filtro se enjuagó con 340–360 g de la sustancia del fármaco formulada, descartándose el enjuague. La sustancia del fármaco formulada restante se filtró luego en garrafas de policarbonato de 10 L, a un volumen objetivo de 5500 $\pm$ 500 mL por garrafa. El filtro fue testado con respecto a la integridad (usando una prueba de punto de burbuja) después de la filtración. La garrafa final puede ser llenada con más del volumen objetivo de la sustancia del fármaco formulada, pero generalmente no más de 8 L. Se tomaron muestras para el testeo en proceso (para información solamente) y testeo de liberación de lote, después de lo cual se aseguraron los cierres de la garrafa a un ajuste de torque de 80 pulg–lb. Las garrafas fueron etiquetadas, y luego almacenadas a –70 °C.

[00183] Monitoreo en proceso durante el proceso de purificación de STM 434

[00184] Las muestras fueron recogidas y evaluadas durante los procesos de purificación como se describe en la Tabla 13.

Tabla 13. Monitoreo en proceso durante el proceso de purificación de STM 434

Método de prueba	de	Parámetro informado	Paso/Muestras ensayadas						
			Cosecha	Cromatografía de la proteína A	Inactivación viral	CEX	HIC	Filtración viral	TFF
Proteína HPLC	A	Concentración de STM 434	Filtración de profundidad	—	—	—	—	—	—
Concentración de proteína por absorbancia de UV		Concentración de STM 434	—	Pool combinado de toso los ciclos	FVIP	Carga pool	Ambos ciclos, Pool	Filtrado	Retentato
CHO HCP ELISA	HCP	Contenido de HCP	Filtración de profundidad	Pool combinado	FVIP	Carga, pool	Pool	—	—
Q-PCR para ADN de CHO		Contenido de ADN de CHO	Filtración de profundidad	Pool combinado	FVIP	Carga. Pool	Pool	—	—
Proteína residual ELISA	A	Contenido de proteína residual	—	Primeros y últimos ciclos Pool combinado	FVIP	Carga pool	Pool	—	—
TAMC por filtración por membrana	por	Biocarga	Filtración de profundidad	Pool combinado	FVIP	Carga, pool	—	—	Retentato
TYMC por filtración por membrana	por	Biocarga	—	—	—	Carga, Pool	—	—	Retentato
Contenido de endotoxina bacteriana (LAL cinético)	de	Endotoxina	Filtración de profundidad	Pool combinado	FVIP	Carga, Pool	—	—	Retentato
HPLC de exclusión de tamaño	de	Pureza	—	Pool combinado	FVIP	Carga, Pool	Ambos ciclos, Pool	Filtrado	Retentato
CE-SDS, reducido		Pureza	—	Pool combinado	FVIP	Carga, Pool	—	—	Retentato
CE-SDS, no reducido	no	Pureza	—	—	FVIP	Carga, Pool	—	—	—

icIEF	Pureza	—	—	—	Carga, Pool	Ambos ciclos, Pool	—	Retenta to
Contenido de ácido siálico	Pureza	—	—	—	Carga, Pool	Ambos ciclos, Pool	—	—

CE–SDS = electroforesis capilar – dodecil sulfato de sodio; CEX = cromatografía de intercambio de cationes; CFU = unidad formadora de colonias; CHO = Ovario de hámster chino; ELISA = ensayo de inmunosorción ligado a enzimas, FVIP = pool de inactivación viral filtrada; HCP = proteína celular huésped; HIC = cromatografía de interacción hidrofóbica; icIEF = enfoque isoeléctrico de capilar dañado; LAL = Lisado de *Limulus ameobocyte*; Q–PCR = reacción en cadena de polimerasa cuantitativa; TAMC = recuento microbiano aeróbico total; TFF = filtración de flujo tangencial; TYMC = recuento de levaduras y mohos en el camino.

[00185] Paso del proceso y rendimientos generales

[00186] El paso individual rinde para las corridas para la elaboración de sustancia del fármaco STM 434 cGMP se proporcionan en la Tabla 14. En general, el procesamiento era reproducible y proporcionó suficiente material con respecto a los ensayos clínicos de fase 1.

Tabla 14. Paso de STM 434 y cálculos de rendimiento general

Operaciones unitarias realizadas por Amgen	DSI Lot 0010039909			
	Volumen (L)	Concen-tración (g/L)	Proteína total (g)	Paso Rendimiento (%)*
Medio de cosecha	1653	2,35	3884,6	—
Filtración de profundidad de la cosecha	1730	2,06	3562,8	92%
Proteína A Cromatografía Carga*	216,2	15,2	3286,2	92%
Proteína A Cromatografía Pool	216,2	15,2	3286,2	100%
Pool de inactivación viral filtrada (DSI)	289,8	11,2	3245,8	99%
Rendimiento general*				84%

DSI Lot 0010039910			
Volumen (L)	Concen-tración (g/L)	Proteína total (g)	Paso Rendimiento (%)*
1790	2,64	4725,6	—
1820	2,36	4295,2	91%
1615	2,36	3811,4	89%*
225,9	15,7	3546,6	83%
296,9	11,6	3444,0	97%
Rendimiento general*			73%

Operaciones unitarias realizadas por CMC Biologics	DS Lote 13-0066 (de DSI Lote 0010039909)			
	Volumen (L)	Concen-tración (g/L)	Proteína total (g)	Paso Rendimiento (%)**
CEX Carga (equivalente a DSI)	259,9	11,256	2925,4	—
CEX Pool	269,3	8,844	2381,7	81%
HIC Carga (acondicionada CEX Pool)	338,8	7,038	2384,5	100%
HIC Pool	442,7	4,882	2161,3	91%
Filtrado viral / TFF Carga	457,3	4,535	2073,9	96%
TFF Pool	28,0	67,416	1887,6	91%
Substancia del fármaco a granel	28,060	68,800	1930,5	102%
Rendimiento general por CMC Biologics**				66%

DS Lote 13-0067 (de DSI Lote 0010039910)			
Volumen (L)	Concen-tración (g/L)	Proteína total (g)	Paso Rendimiento (%)**
294,2	11,472	3375,1	—
302,8	9,405	2847,8	84%
377,5	7,107	2682,9	94%
491,7	5,067	2491,4	93%
504,3	4,906	2474,1	99%
36,7	67,788	2487,8	101%
36,640	70,300	2575,8	104%
Rendimiento general por CMC Biologics**			76%

*Los porcentajes del rendimiento informados para Amgen se basan en la entrada inicial de la cosecha de cultivo celular para cada corrida de elaboración. Las diferencias en las dos corridas se deben a diferentes rendimientos del biorreactor, y a la decisión de Amgen de limitar el paso de la cromatografía de la proteína A a cinco ciclos mientras mantiene los parámetros de carga de la proteína objetivo.

**Los porcentajes de rendimiento informados para CMC Biologics se basan en la entrada inicial de DSI, cuyos volúmenes disponibles fueron diferentes para cada corrida de elaboración. Los valores de concentración de DSI informados en esta sección de la tabla son aquellos determinados por CMC Biologics.

Ejemplo 2: Descripción del proceso de elaboración y controles del proceso

[00187] La sustancia del fármaco a granel formulada fue enviada congelada para el procesamiento aséptico a un producto de fármaco no etiquetado, que luego fue enviado para ser etiquetado, envasado, y su distribución a sitios clínicos. Cada lote de inyección de STM 434 incluye un mínimo de 7000 viales llenos disponibles para el uso en ensayos clínicos. Un diagrama de flujo del proceso para el producto del fármaco final se muestra en la Figura 3.

[00188] Preparación de los componentes y el equipo

[00189] Los viales fueron removidos del envase de vidrio del fabricante y se lavaron con agua para inyección (WFI) caliente. Los viales lavados se colocaron luego en bandejas de acero inoxidable cubiertas y se despirogenaron en un horno de esterilización con calor seco. El aire del horno de esterilización era filtrado con HEPA. Los tapones se lavaron y enjuagaron con WFI caliente, seguido por esterilización y secado en un autoclave. Todos los componentes estériles/despirogenados fueron almacenados en un ambiente controlado antes del uso.

[00190] Se usó una propuesta exagerada para desarrollar y validar los ciclos de esterilización por vapor. Los ciclos usados proporcionan un nivel de seguridad de esterilidad (SAL) de al menos 1×10^{-6} . Los ciclos de despirogenación con calor seco usados proporcionan un mínimo de reducción de 3-log de endotoxina.

[00191] Proceso de elaboración

[00192] Los controles del material recibido incluían el testeo de la identidad y la confirmación de la aceptabilidad del certificado de análisis de la sustancia del fármaco a granel formulada. La sustancia del fármaco STM 434 fue descongelada estáticamente (no menos de 7 días) a 2–8 °C y se mantuvo a esta temperatura para el procesamiento ulterior. El material se llevó al área operativa y se dejó equilibrar a temperatura ambiente (30–

60 minutos). Para un lote típico, 2 garrafas, conteniendo 5,5 L cada una, fueron pooled en una garrafa de vidrio de 13 L y se mezclaron durante no menos de 10 minutos a 300 rpm. Se recogió una muestra para el testeo de la biocarga. Las operaciones de pooling y mezclado ocurren en un área de ambiente controlado de ISO Clase 7 (antes FS209E Clase 10.000). El contenedor de la solución a granel formulada reunida se transfirió luego en preparación para la esterilización por filtro del producto. Este contenedor reunido fue conectado al conjunto de filtro colocado en autoclave. El conjunto de filtro [tubería] también fue conectado al recipiente de compensación de llenado. La solución es esterilizada por filtración por membrana a través de dos filtros de grado de esterilización, usados en serie, con un grado de tamaño de poros de 0,22 μm . Los filtros de membrana fueron esterilizados y se testeó su integridad (usando una prueba de punto de burbuja) antes y después del uso. Las muestras fueron ensayadas de acuerdo con las especificaciones escritas.

[00193] El recipiente de compensación de llenado que contenía la solución a granel formulada reunida estéril fue conectado luego asépticamente al llenado. La solución a granel formulada reunida estéril fue llenada asépticamente en los viales despirogenados estériles. Los tapones y sellos estériles fueron colocados luego sobre cada vial dentro de la unidad RABS. La operación de llenado se realizó mediante operadores con indumentaria adecuada y entrenados adecuadamente. Estas operaciones fueron diseñadas, equipadas, y operadas para proporcionar las condiciones ambientales adecuadas para el procesamiento aséptico del producto.

[00194] Se realizaron chequeos del peso de llenado durante la operación de llenado. Después que los viales se llenaron, taparon y sellaron, fueron inspeccionados para asegurarse de que no hubiera partículas extrañas visibles, precipitados, contaminación visible, evidencia de derrame, ruptura del vial, o tapones o sellos inaceptables. Adicionalmente, se realizó un muestreo estadístico de todo el lote de viales y se inspeccionó por la unidad de calidad.

[00195] Se recogieron viales de muestra en este punto para el testeo de control de calidad (QC). Todos los viales aceptables fueron colocados en almacenamiento en cuarentena a -20 ± 5 °C hasta -70 ± 10 °C.

[00196] Las áreas de ambiente controlado se mantuvieron bajo presión positiva con aire filtrado con HEPA para reducir la posibilidad de contaminación transportada por aire. La performance de los filtros se monitoreó periódicamente. El acceso a las salas de llenado estaba restringido al personal asociado con la operación de llenado que habían completado el entrenamiento necesario en operaciones asépticas.

[00197] Durante las operaciones asépticas tales como llenado y tapado, el ambiente ISO Clase 5 fue monitoreado con respecto al contenido microbiano y el contenido de partículas no viables. Se establecieron acciones apropiadas y niveles de alerta tanto para los contaminantes viables como para las partículas no viables para asegurar la calidad apropiada del aire del ambiente de llenado y las superficies importantes.

[00198] Validación del llenado de los medios

[00199] Se realizaron llenados de medios para simular operaciones de llenado a intervalos de rutina (6 meses) para proporcionar una seguridad adicional sobre la capacidad de procesamiento aséptico del personal, la instalación y el equipamiento. Los llenados de medios fueron realizados según el protocolo aprobado.

[00200] Los datos de las simulaciones del proceso (llenados de medios) que sirven para validar los procesos específicos de filtración, llenado, taponado y tapado usados en la elaboración del producto del fármaco, incluían, pero no estaban limitados a, notación de la sala de llenado, tipo y tamaño del cierre del contenedor, volumen de medios, tipo de medios, número de unidades llenadas, duración del llenado y períodos de retención, número de unidades incubadas, número de unidades positivas, parámetros de incubación, fecha del llenado de los medios, intervenciones del proceso, monitoreo microbiano, y parámetros del proceso.

[00201] Los viales de muestra llenados con los medios fueron agitados/invertidos inicialmente para asegurarse de que el TSB estuvo en contacto con todas las superficies internas, los contenedores fueron incubados verticalmente durante 7 días (no menos de 168 horas) a 20°–25 °C, seguido por incubación a 30°–35 °C invertidos durante 7 días adicionales (no menos de 168 horas). Después de la incubación, se realizó un testeó de promoción de crecimiento (USP) farmacopeico en muestras representativas de los viales con los medios. La falla de la prueba de promoción del crecimiento posincubación da por resultado la invalidación de una corrida de llenado de medios. Todas las corridas de llenados de medios que son abortados o invalidados fueron seguidos por una investigación. Las simulaciones del proceso fueron diseñadas para incorporar el peor caso y/o las condiciones de desafío. Se aplicó un concepto de horquillado para la definición de las combinaciones de cierre del contenedor del peor caso. La definición de los formatos de peor caso se basó en el volumen del vial, las dimensiones, la apertura, y la complejidad del proceso (es decir, líquido o secado por congelación). Los procesos de secado por congelación pueden ser representativos para los

procesos líquidos como resultado de la mayor complejidad de un proceso de liofilización. Las intervenciones de rutina se realizaron en cada llenado de medios.

[00202] Etiquetado y envasado (contenedor primario)

[00203] Después de las operaciones de llenado/terminación, los viales de inyección de STM 434 fueron colocados en cajas de cartón para el almacenamiento intermedio. Las cajas fueron etiquetadas con información específica del producto y específica del lote y luego se colocaron en almacenamiento congelado. Estas cajas de viales fueron enviadas a -70 ± 10 °C, y los viales en las cajas son almacenados a -20 ± 5 °C. La operación de etiquetado ocurre en una sala a temperatura ambiente. Pequeños lotes de viales fueron llevados a la sala y etiquetados dentro de las 12 horas, luego volvieron a -20 ± 5 °C. Cada vial fue preparado para etiquetado limpiando la condensación residual del exterior, y luego fijando la etiqueta.

[00204] Los componentes impresos fueron inspeccionados para asegurarse de que el contenido era apropiado para la etiqueta maestro. Después de completar la inspección, las etiquetas fueron liberadas para ser usadas en contenedores primarios. Se usaron procedimientos escritos aprobados para los procesos de etiquetado y envasado.

Ejemplo 3: Fórmula del lote para STM 434

[00205] La inyección de STM 434 fue formulada como 70 mg/mL de STM 434, fosfato de potasio 10 mM, 8,8% (p/v) de sacarosa, 0,006% (p/v) de polisorbato 20, pH 6,7. Cada vial de 5 mL era llenado nominalmente con no menos de 1,0 mL de sustancia del fármaco STM 434. Para cada uno de los primeros dos lotes de cGMP de inyección de STM 434, se recibieron 11 L de la sustancia del fármaco de STM 434 de CMC Biologics para realizar la elaboración del producto del fármaco. Este volumen se usa en la Tabla 155 para definir la cantidad de cada componente por lote.

[00206] Tabla 15. Componentes de la inyección de STM 434 y tamaño típico del lote

Ingrediente	Grado	Cantidad por mL	Cantidad por lote (11 L)
STM 434	S-SPEC-QA-002	70 mg	770 gramos
Fosfato de potasio monobásico	NF, Ph. Eur.	0,714 mg	7.854 gramos
Fosfato de potasio dibásico	USP, Ph. Eur.	0,827 mg	9.097 gramos
Sacarosa	NF, Ph. Eur., BP, JP	88,0 mg	968 gramos
Polisorbato 20	NF, Ph. Eur., BP	0,06 mg	0,66 gramos

Ácido clorhídrico	NF, Ph. Eur., BP	Según requiera se	Según requiera se
Agua para inyección	USP, Ph. Eur.	c.s. para el peso objetivo	c.s. para el peso objetivo

Ejemplo 4: Protocolo de estudio de STM 434.

[00207] OBJETIVOS DEL ESTUDIO

[00208] El objetivo principal del estudio es definir la dosis máxima tolerada (MTD) de STM 434 administrada como monoterapia o en combinación con quimioterapia con doxorrubicina liposomal en sujetos con cáncer ovárico u otros tumores sólidos avanzados.

[00209] Los objetivos secundarios son como sigue:

- Definir la dosis recomendada de la Fase 2 (RP2D) en el caso de que no haya una MTD
- Evaluar la incidencia de eventos adversos (AEs) y cambios clínicamente significativos en las pruebas de laboratorio, electrocardiogramas (ECGs), y signos vitales durante la terapia con STM 434
- Evaluar la incidencia de la formación de anticuerpos anti-STM 434
- Recoger datos farmacocinéticos (PK) durante la terapia con STM 434
- Recoger datos de ECG durante la terapia con STM 434
- Recoger datos de la eficacia antitumoral preliminar durante la terapia con STM 434
- Evaluar la relación entre los datos de la eficacia antitumoral y cada uno de los siguientes: activina A sérica, niveles de mRNA de INHBA/ACVR2B del tumor y estado de mutación del tumor de las células claras / del endometrio/ de la granulosa.
- Recoger datos de masa corporal magra, masa grasa, densidad mineral ósea (en sujetos sin metástasis ósea), perfiles lipídicos, glucosa en ayunas, insulina en ayunas, evaluación del modelo homeostático (HOMA), hemoglobina A1c (HbA1c), y distancia de caminata de 6 minutos durante la terapia con STM 434
- Recoger datos de línea de base y en tratamiento para los biomarcadores (tales como antígeno de cáncer-125 [CA-125], antígeno específico de la próstata [PSA], antígeno de carbohidratos 19-9 [CA 19-9], antígeno carcinoembrionario [CEA]), activina A, hormona folículo-estimulante (FSH), estradiol, y testosterona.

[00210] Los objetivos de exploración del estudio son evaluar la relación entre los parámetros PK y los parámetros PD, el peso corporal, el área de superficie corporal, masa corporal magra, masa grasa, masa magra apendicular, densidad mineral ósea (en sujetos sin metástasis ósea), perfiles lipídicos, glucosa en ayunas, insulina en ayunas, distancia de caminata de 6 minutos, formación de anticuerpos anti-fármaco, biomarcador y datos de ECG.

[00211] DISEÑO DEL ESTUDIO

[00212] Este es un estudio multicéntrico, de etiqueta abierta, de brazo único en sujetos adultos con cáncer ovárico o tumores sólidos avanzados. El estudio se realizará en tres partes, como se describe más abajo. Un esquema de los procedimientos del estudio se muestra en la Tabla 16.

[00213] Parte 1 del estudio

[00214] La Parte 1 es un estudio de aumento de la dosis de etiqueta abierta que incorpora un diseño de 3+3 en sujetos con tumores sólidos avanzados. Un total de 15–30 sujetos serán enrolados en 5 cohortes de dosis secuenciales planificadas para evaluar la seguridad, tolerabilidad, y perfiles PK de STM 434 IV a 5 niveles de dosis (0,25 mg/kg IV, 0,5 mg/kg IV, 1 mg/kg IV, 2 mg/kg IV y 4 mg/kg IV). En ausencia de una señal de seguridad durante la ventana de evaluación de la toxicidad que limita la dosis (DLT), se aumentará el STM 434 en incrementos de dosis de 100% planificados. Si se observa una señal de seguridad (≥ 2 AEs Grado 2 relacionados con STM 434 clínicamente significativos o una toxicidad Grado 3 relacionada con STM 434), todos los aumentos de dosis ulteriores entre cohortes ocurrirán en incrementos de dosis $\leq 50\%$ y se estudiará un nivel o niveles de dosis apropiados adicionales para evitar toxicidad excesiva. Cada nivel de dosis será evaluado secuencialmente, y cada cohorte de dosis consistirá en 3–6 sujetos (el número dependerá de si se observan DLTs).

[00215] El aumento de la dosis de una cohorte a la siguiente será determinada por el auspiciante junto con los investigadores y se basará en AEs emergentes del tratamiento, datos clínicos de laboratorio, hallazgos del examen físico, incluyendo signos vitales, ECGs, y datos PK disponibles después que 3 sujetos dentro de una cohorte hayan completado 28 días de tratamiento. El aumento de la dosis ocurrirá si la incidencia de DLTs o AEs serios relacionados con STM 434 (SAEs) durante los primeros 28 días del tratamiento del estudio es $< 33\%$.

[00216] En una cohorte dada, si ninguno de los 3 sujetos experimenta una DLT durante los 28 días desde la administración inicial de STM 434, entonces se realizará el aumento de la dosis, y 3 sujetos serán enrolados en la cohorte al nivel de dosis siguiente. Sin embargo, si se

observan ≥ 2 de AEs relacionados con STM 434 de Grado 2 clínicamente significativos o un AE de Grado 3 relacionado con STM 434–E clínicamente significativo, el aumento de dosis ulterior se reducirá a incrementos de dosis $\leq 50\%$. Si 1 de los 3 sujetos en una cohorte experimenta una DLT, 3 los sujetos adicionales serán enrolados con el mismo nivel de dosis. Si sólo 1 de 6 sujetos dentro de una cohorte experimenta una DLT o un SAE relacionado con STM 434 durante los primeros 28 días de tratamiento, la cohorte siguiente puede comenzar su reclutamiento. Si se observa una DLT, todos los otros aumentos de dosis se reducirán a incrementos de dosis $\leq 50\%$. Si 2 o más de los 6 sujetos dentro de una cohorte experimentan una DLT o un SAE relacionado con STM 434 durante los primeros 28 días de tratamiento, esta dosis se considerará la dosis tóxica. El aumento de la dosis puede seguir a una dosis menor o un esquema menos frecuente en base a la toxicidad emergente, los datos PK o PD, hasta que se determina la MTD. Dosis mayores que 4 mg/kg cada 4 semanas pueden ser exploradas si los datos PK observados se encuentran por debajo de los niveles predichos.

[00217] Parte 2 del estudio

[00218] La Parte 2 es un estudio de etiqueta abierta, diseñado para obtener seguridad adicional y datos de eficacia exploratoria en sujetos con tumores avanzados de las células claras del ovario/endometrio, de la granulosa, y tumores serosos ováricos/de las trompas de Falopio/peritoneales primarios. Un total de 24 sujetos se inscribirán en 2 cohortes en esta parte del estudio. Una cohorte incluirá 6 sujetos con adenocarcinoma de células claras y 6 sujetos con tumores de células de la granulosa; la segunda cohorte incluirá 12 sujetos con tumores serosos. Todos los sujetos recibirán STM 434 IV en el RP2D. La inscripción en la Parte 2 es contingente después de establecer la RP2D en la Parte 1.

[00219] Parte 3 del estudio

[00220] La Parte 3 es un estudio de aumento de la dosis de etiqueta abierta de STM 434 en combinación con quimioterapia con doxorubicina liposomal que incorpora un diseño 3+3 en sujetos con cáncer ovárico, de las trompas de Falopio o peritoneal primario que han recibido tratamiento previo con un régimen de quimioterapia a base de platino o que no pueden recibir una quimioterapia a base de platino. Después que se completó la Parte 1 y se estableció la RP2D, se enrolarán 6–12 sujetos en la Parte 3. Las Partes 2 y 3 enrolarán sujetos en forma concurrente. Los sujetos en la Parte 3 serán evaluados en 2 cohortes de dosis de 3–6 sujetos cada uno (el número de sujetos por cohorte depende de si se observan DLTs). Una cohorte recibirá STM 434 a un nivel de dosis menor que la RP2D y la segunda cohorte recibirá STM 434 a la RP2D; ambas cohortes recibirán doxorubicina liposomal a 40 mg/m².

[00221] Para ambas cohortes, los sujetos recibirán una infusión de doxorubicina liposomal antes de recibir STM 434. Los estudios de laboratorio, incluyendo la exploración de adquisición múltiple cerrada (MUGA), serán evaluados antes de cada administración de doxorubicina liposomal. Si es necesario, se puede implementar la reducción de la dosis de 40 mg/m^2 a 30 mg/m^2 de acuerdo con los lineamientos de manejo de la toxicidad.

[00222] Los perfiles de seguridad, tolerancia y PK de STM 434 cuando se administra concomitantemente con la doxorubicina liposomal serán evaluados. La dosis menor de STM 434 (es decir, un nivel de dosis menor que la RP2D) será evaluada primero; el aumento de la dosis será determinado por el auspiciante junto con los investigadores y se basará en los AEs que emergen del tratamiento, los datos clínicos de laboratorio, los hallazgos del examen físico incluyendo signos vitales, ECGs, y datos PK disponibles después que los 3 sujetos dentro de la cohorte han completado los 28 días de terapia usando el diseño 3+3 indicado para la Parte 1.

[00223] Toxicidades que limitan la dosis

[00224] Una DLT se definirá como cualquier toxicidad relacionada Grado ≥ 3 (de acuerdo con los Criterios de Terminología comunes para Eventos Adversos [CTCAE], versión 4.03) no hematológica (excluyendo toxicidades no relacionadas), o cualquier toxicidad hematológica Grado ≥ 4 que dure 7 días, neutropenia febril o trombocitopenia Grado 3 con hemorragia activa.

[00225] Un paciente que experimente una DLT que desea retomar la terapia con STM 434 puede hacerlo a discreción del investigador cuando la toxicidad ha bajado a un CTCAE Grado ≤ 1 o valores de línea de base, y si el paciente no ha experimentado avance de la enfermedad.

[00226] Dosis máxima tolerada

[00227] La MTD se define como el nivel de dosis más alto con una incidencia de DLT $< 33\%$ de la cohorte de sujetos.

[00228] Dosis recomendada de la fase 2

[00229] La RP2D será definida bajo consideración de los datos de MTD, PK, biomarcador farmacodinámico y respuesta antitumoral.

[00230] Aleatorización y estudio a ciegas

[00231] Este es un estudio de etíquete abierta, no aleatorizado, no a ciegas. Los sujetos serán asignados a una cohorte de dosis en el orden en el que califican para el estudio.

[00232] **CRITERIOS DE SELECCIÓN DE SUJETOS**

[00233] Criterios de inclusión

[00234] Se considerará que un sujeto es elegible para participar en este estudio si se satisfacen todos los criterios de inclusión siguientes:

1. Hombres y mujeres postmenopáusicas ≥ 18 años de edad
2. Tumores sólidos avanzados con diagnóstico histológico que confirma el cáncer
3. Sujetos con enfermedad metastásica recurrente o localmente avanzada considerados refractarios o que no toleran todos los tratamientos estándar disponibles para su tumor, o aquellos con tumores para los cuales no hay un tratamiento estándar disponible
4. Sujetos con tumores serosos ováricos/de las trompas de Falopio / peritoneales primarios, tumores de las células de la granulosa o tumores de las células claras considerados refractarios/resistentes al platino, definidos como habiendo pasado al menos un régimen quimioterapéutico a base de platino previo con un intervalo libre de platino subsiguiente de < 12 meses, habiendo experimentado un avance durante la terapia a base de platino, o teniendo enfermedad persistente después de la terapia a base de platino, son elegibles. Los sujetos que no toleran el platino, definidos como incapaces de recibir más platino debido a la toxicidad, son elegibles.
5. Enfermedad mensurable usando los Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST 1.1)
6. Estado de performance según el grupo Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) de 0 ó 1
7. Capaces de caminar al menos 30 metros sin asistencia de otra persona (uso de dispositivos de ayuda tales como un bastón o un andador está permitido)
8. Deseosos y capaces de proporcionar un consentimiento informado por escrito
9. Las mujeres postmenopáusicas tienen que cumplir uno o más de los siguientes requisitos:
 - a. 12 meses de amenorrea espontánea
 - b. 6 meses de amenorrea espontánea con $\text{FSH} > 40 \text{ IU/L}$
 - c. Ooforectomía bilateral posquirúrgica con o sin histerectomía

[00235] Para la Parte 2 del estudio, tienen que cumplirse los siguientes criterios de inclusión adicionales:

10. Para la Cohorte 6, los sujetos tienen que tener un carcinoma de las células claras del ovario/endometrio refractario/ resistente/ que no tolera el platino (según se definió en el criterio de inclusión #4) y tumores de las células de la granulosa ováricos
11. Para la Cohorte 7, los sujetos tienen que tener cáncer seroso ovárico/ de las trompas de Falopio / peritoneal primario refractario/ resistente/ que no tolera el platino (según se definió en el criterio de inclusión #4)

[00236] Para la Parte 3 del estudio, tiene que satisfacerse el siguiente criterio de inclusión adicional:

12. Para las Cohortes 8 y 9, los sujetos tienen que tener cáncer ovárico /de las trompas de Falopio / peritoneal primario avanzado refractario/ resistente/ que no tolera el platino (según se definió en el criterio de inclusión #4)

[00237] Criterios de exclusión

[00238] Un sujeto no será elegible para participar en el estudio si se cumplen cualesquiera de los siguientes criterios:

1. Condición médica seria concurrente no resuelta o incontrolada, tal como una infección, cumplimiento limitado del protocolo o exposición del sujeto a un riesgo extremo
2. Toxicidades no resueltas de la terapia anti-cáncer previa, tal como neuropatía motora o sensorial, con un CTCAE (versión 4.03) Grado ≥ 2 con la excepción de alopecia
3. Historia de hemorragia gastrointestinal dentro de los 6 meses del Ciclo 1 Día 1
4. Presencia de QTcF > 470 msec, historia de intervalo QT hereditario prolongado, o cualquier arritmia (tal como bloqueos de ramas) que impedirían la evaluación del intervalo QT
5. Infarto del miocardio, angina inestable dentro de los 6 meses del Ciclo 1 Día 1, o insuficiencia cardíaca congestiva New York Heart Association $\geq$ clase II
6. Tests de función hepática elevados, incluyendo bilirrubina total $> 1,5 \times$ el límite superior al normal (ULN; a menos que el sujeto haya documentado la enfermedad de Gilbert), aspartato aminotransferasa (AST) o alanina aminotransferasa (ALT) $> 3,0 \times$ ULN (para sujetos con metástasis hepática conocida, AST o ALT $> 5 \times$ ULN)
7. Creatinina $> 1,5 \times$ ULN y una depuración de creatinina estimada de < 60 mL/min (usando la ecuación de Cockcroft–Gault)
8. Hemoglobina < 9 g/dL; plaquetas $< 100 \times 10^9/L$ (no tiene que haber recibido transfusión dentro de las 4 semanas del Ciclo 1 Día 1); recuento absoluto de neutrófilos (ANC) $< 1,5 \times 10^9/L$ (sin soporte del factor estimulante de las colonias de granulocitos dentro de las 2 semanas del Ciclo 1 Día 1)
9. Quimioterapia, terapia hormonal o terapia radiante dentro de las 3 semanas del Ciclo 1 Día 1 (Nota: los sujetos que reciben terapia con hormona liberadora de gonadotropina son elegibles)
10. Terapia con anticuerpos/biológica dentro de 5 vidas medias o 4 semanas (según la que se más prolongada) del Ciclo 1 Día 1
11. Cirugía mayor dentro de las 8 semanas o cirugía menor dentro de las 4 semanas del Ciclo 1 Día 1
12. Obstrucción intestinal actual (aquellos que tienen una historia de obstrucción intestinal son elegibles)
13. Metástasis en el cerebro
14. Presencia de ascitis o efusión pleural que requiere intervención médica frecuente (más de $1 \times$ por semana)

15. Presencia de un dispositivo de shunt venoso portal o con historia de resección hepática extensa (más de un segmento)
 16. Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) conocida
 17. Infección por hepatitis B o C activa
 18. Tratamiento previo con cualquier producto de investigación dentro de las 4 semanas del Ciclo 1 Día 1
 19. Mujer que potencialmente puede tener hijos, u hombre que tiene una pareja que potencialmente puede tener hijos, que no desea usar un método anticonceptivo altamente efectivo (es decir, uno que resulta en menos de 1% de embarazos por año) cuando se usa en forma consistente y correctamente, tales como implantes, inyectables, anticonceptivos orales combinados, algunos dispositivos anticonceptivos intrauterinos, abstinencia sexual o un hombre vasectomizado. Hombres que no desean usar una medida anticonceptiva altamente efectiva durante su participación en este estudio, que tienen parejas femeninas y/o que no desean abstenerse de donar esperma mientras realizan el tratamiento con STM 434 y durante 3 meses después de la última administración de la dosis.
 20. Mujeres que están amamantando
 21. Historia de epistaxis que requiere intervención médica o quirúrgica (tal como taponamiento nasal) dentro de los 6 meses del Ciclo 1 Día 1
 22. Historia de hemorragia del sistema nervioso central
 23. Historia de diátesis hemorrágica o defecto de las plaquetas cualitativo conocido (incluyendo la enfermedad de von Willebrand)
 24. Historia de telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT, síndrome de Osler–Weber–Rendu)
 25. Necesidad regular de uso crónico de aspirina o agentes antiplaquetarios (ticlopidina o clopidogrel); si se discontinúan la aspirina/los agentes antiplaquetarios durante la selección, el período de abstinencia tiene que ser ≥ 2 semanas
- [00239]** Para la Parte 3 del estudio, los sujetos no serán elegibles si cumplen con cualquiera de los siguientes criterios de exclusión adicionales:
26. Reacciones de hipersensibilidad a una formulación convencional de doxorubicina HCl o a los componentes de doxorubicina liposomal
 27. Dosis acumulativa de doxorubicina HCl previa $> 300 \text{ mg/m}^2$, o dosis acumulativa de epirubicina previa $> 500 \text{ mg/m}^2$
 28. Fracción de eyección cardíaca disminuida menor que el límite menor al normal por una exploración MUGA o un ecocardiograma (ECHO) dentro de los 30 días del Ciclo 1 Día 1

[00240] Criterios de retiro del sujeto

[00241] Un sujeto puede retirarse antes de completar el estudio por cualquiera de las siguientes razones:

- Retiro del consentimiento por el sujeto
- Aparición de una DLT u otro AE que evita la participación ulterior
- Efectos colaterales sostenidos relacionados con STM 434 y/o doxorrubicina liposomal (para la Parte 3 solamente) que no vuelven a CTCAE Grado 1 o menos con tratamiento médico apropiado dentro de los 30 días. Un sujeto puede ser retirado del estudio si una toxicidad individual clínicamente importante (debido a o bien STM 434 o a doxorrubicina liposomal) continúa durante más de 30 días sin volver a CTCAE Grado 1 o menos.
- Falta de cumplimiento significativa del sujeto con el protocolo
- El sujeto elige tomar un tratamiento prohibido, tal como el uso de una medicación o dispositivo en investigación
- Empeoramiento de las condiciones clínicas, las que, en la opinión del investigador, requieren un tratamiento médico específico inmediato
- Cierre temprano del estudio por el auspiciante

[00242] TRATAMIENTO CON EL PRODUCTO EN INVESTIGACIÓN

[00243] Descripción y manipulación del fármaco en estudio

[00244] Formulación

[00245] El STM 434 es formulado como una solución acuosa estéril prevista para la administración IV, conteniendo 70 mg/mL de STM 434, tampón fosfato de potasio 10 mM, 8,8% (p/v) de sacarosa, y 0,006% (p/v) de polisorbato 20 a pH 6,7.

[00246] Envasado y etiquetado

[00247] La solución de STM 434 formulada es envasada en viales de vidrio de 5 mL (con un volumen de llenado objetivo de 1,2 mL para suministrar 1,0 mL), con tapones de fluoropolímero de 13 mm y sellos de 13 mm. Cada vial está previsto para un solo uso.

[00248] Almacenamiento y manipulación

[00249] Los viales de STM 434 son almacenados en un congelador sin sistema antiescarcha a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). El producto debería ser almacenado de acuerdo con la información provista en la etiqueta.

[00250] Antes del uso, el producto debería ser descongelado durante la noche en un refrigerador a $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$; el producto puede ser mantenido a esta temperatura durante hasta 7 días. La exposición a temperaturas más altas y la agitación enérgica del vial deberían evitarse porque esas condiciones pueden llevar a una pérdida de la potencia y la integridad estructural del STM 434. Una vez descongelado, el producto no deber ser congelado nuevamente.

[00251] Remitirse al Manual de Farmacia para cualquier almacenamiento adicional, manipulación o datos de estabilidad actualizados del suministro del fármaco en estudio.

[00252] Administración del fármaco en estudio

[00253] STM 434

[00254] STM 434 será administrado a una dosis planificada para cada cohorte, como se especifica a continuación.

[00255] En la Parte 1, las cohortes de dosis planificada son como sigue:

- Cohorte 1: 0,25 mg/kg de STM 434 IV cada 4 semanas
- Cohorte 2: 0,5 mg/kg de STM 434 IV cada 4 semanas
- Cohorte 3: 1 mg/kg de STM 434 IV cada 4 semanas
- Cohorte 4: 2 mg/kg de STM 434 IV cada 4 semanas
- Cohorte 5: 4 mg/kg de STM 434 IV cada 4 semanas

[00256] En la Parte 2, las cohortes de dosis planificadas son como sigue:

- Cohorte 6: STM 434 a la RP2D IV cada 4 semanas a 6 sujetos con adenocarcinoma de las células claras y a 6 sujetos con tumores de células de la granulosa
- Cohorte 7: STM 434 a la RP2D IV cada 4 semanas a 12 sujetos con tumores ováricos serosos

[00257] En la Parte 3, los sujetos recibirán STM 434 y doxorrubicina liposomal. Los Sujetos recibirán primero la infusión de doxorrubicina; después de completar esta infusión, los sujetos recibirán entonces STM 434 IV. Las cohortes de dosis planificada para la Parte 3 son como sigue:

- Cohorte 8: STM 434 a un nivel de dosis menor de la RP2D IV + doxorrubicina liposomal (40 mg/m² IV) cada 4 semanas
- Cohorte 9: STM 434 a la RP2D IV + doxorrubicina liposomal (40 mg/m² IV) cada 4 semanas

[00258] Los sujetos en las Partes 1, 2, y 3 serán tratados con STM 434 hasta el avance de la enfermedad, a menos que se observe una toxicidad inaceptable. El avance de la enfermedad se basará en mediciones radiográficas de acuerdo con los criterios de RECIST 1.1 o las mediciones de los marcadores tumorales.

[00259] Los sujetos en la Parte 3 pueden continuar recibiendo STM 434 si se suspende o discontinúa la doxorrubicina liposomal por cualquier razón distinta que la DLT observada durante los primeros 28 días de tratamiento combinado. La modificación y el ajuste de la dosis

para la doxorubicina liposomal seguirá la información de prescripción para este producto. El número máximo de ciclos de doxorubicina liposomal que se administrarán es 6.

[00260] Doxorubicina liposomal

[00261] Los sujetos en la Parte 3 (Cohortes 8 y 9) recibirán primero una infusión de doxorubicina liposomal (40 mg/m²); cuando se completó esta infusión, los sujetos recibirán entonces su dosis IV de STM 434.

[00262] Las dosis de doxorubicina liposomal de hasta 90 mg deben ser diluidas en 250 mL de una solución de dextrosa al 5% (D5W). Dosis $\geq$ 90 mg deberían ser diluidas en 500 mL de D5W. La primera infusión de doxorubicina liposomal debería ser administrada a una velocidad de 1 mg/minuto. Si no se observan reacciones a la infusión, se pueden administrar infusiones subsiguientes durante 1 hora.

[00263] Antieméticos para la quimioterapia con emetogenicidad moderada deberían ser prescritos de acuerdo con las instrucciones institucionales.

[00264] Duración del tratamiento

[00265] La selección comenzará hasta 14 días antes de la administración de la dosis (Ciclo 1 Día 1), con la excepción de que se pueden realizar exploraciones radiográficas dentro de los 30 días antes de comenzar con la primera dosis de la medicación en estudio. Los sujetos en las Partes 1, 2, y 3 serán tratados con STM 434 hasta el avance de la enfermedad, a menos que se observe una toxicidad inaceptable. El avance de la enfermedad se basará en las mediciones radiográficas de acuerdo con los criterios de RECIST 1.1 o las mediciones de los marcadores tumorales. Si se usa CA-125 como la medición del marcador tumoral, los resultados serán evaluados con los lineamientos de consenso del Gynecologic Cancer Intergroup (GCIG). Si se usa PSA como la medida del marcador tumoral, los resultados serán evaluados con los lineamientos de consenso del Prostate Cancer Working Group (PCWG).

[00266] Los sujetos en la Parte 3 pueden continuar recibiendo STM 434 si se suspende o discontinúa la doxorubicina liposomal por cualquier razón distinta de una DLT observada durante los primeros 28 días de tratamiento combinado.

[00267] **EVALUACIONES DE EFICACIA Y SEGURIDAD**

[00268] Cada variable de eficacia y seguridad se describe más abajo.

[00269] Farmacocinética

[00270] Los niveles de STM 434 en las muestras de sangre serán determinados por un laboratorio central. Los siguientes parámetros PK de STM 434 serán estimados de los niveles en sangre usando métodos farmacocinéticos no compartimentales estándar:

- Vida media terminal ($t_{1/2}$)
- Depuración (CL)
- Tiempo medio de residencia (MRT)
- Volumen de distribución (V_d)
- Volumen de estado estable (V_{ss})

[00271] Además, para los sujetos en la Parte 3 (Cohortes 8 y 9), que recibirán doxorubicina liposomal además de STM 434, se tomarán muestras de sangre y se enviarán a un laboratorio central para la determinación de los niveles de doxorubicina/doxorubicinol. Se estimarán los parámetros PK, como se indicó más arriba.

[00272] Evaluaciones de eficacia

[00273] Avance radiográfico del tumor

[00274] El avance radiográfico del tumor será determinado por la evaluación del investigador usando los criterios de RECIST 1.1 en base a CT (o MRI) y exploración ósea (sujetos con metástasis óseas solamente). La selección de la modalidad CT o MRI será por el investigador. Las lesiones objetivo (si están presentes, hasta 5 por sujeto) serán medidas en la línea de base y seguidas durante el estudio. La duración de la respuesta radiográfica será registrada como el tiempo desde la observación inicial de una respuesta radiográfica objetiva hasta la fecha del avance de la enfermedad o la muerte. La supervivencia libre de avance radiográfico será registrada como el tiempo desde el Ciclo 1 Día 1 hasta la fecha del avance radiográfico de la enfermedad o la muerte.

[00275] Composición corporal

[00276] La masa corporal magra, la masa apendicular magra, y la masa grasa, y la distribución de la grasa (visceral y subcutánea) será determinada por DXA según se detalla en el Manual de Radiología. Las exploraciones de DXA serán analizadas por el laboratorio central de radiología.

[00277] Test de función muscular: prueba de caminata de 6 minutos

[00278] Descripción

[00279] El 6MWT mide la distancia que el sujeto cubre cuando camina sobre una superficie plana durante un período de tiempo de 6 minutos. En este estudio, el 6MWT será realizado de acuerdo con los lineamientos de la American Thoracic Society (ATS). Estos lineamientos fueron desarrollados para pacientes que pueden tener morbilidades del corazón o el pulmón concurrentes y tienen un nivel general reducido de actividad física, similar a los

pacientes oncológicos avanzados. Así, el procedimiento para el 6MWT en el estudio actual ha sido planificado de acuerdo con los lineamientos de la ATS.

[00280] Entrenamiento del personal

[00281] Sólo personal entrenado por el auspiciante/representante del auspiciante puede conducir el 6MWT. Los sitios no pueden comenzar a conducir el 6MWT antes de que el auspiciante/representante del auspiciante evalúe el área a ser usada y entrene al personal del sitio que conducirá el test. La misma área tiene que ser usada para todas las evaluaciones para cada sujeto individual durante todo el estudio.

[00282] Parámetros de laboratorio para la eficacia

[00283] Biomarcadores

[00284] Biomarcadores tumorales

[00285] Biomarcadores tumorales séricos (tales como CA-125 para los sujetos con cáncer ovárico, PSA para los sujetos con cáncer de próstata, CA 19-9 para los sujetos con cáncer pancreático y CEA para los sujetos con cáncer de colon) serán monitoreados en la línea de base y a través del estudio. La respuesta del marcador tumoral y el avance del marcador tumoral (TTTMP) será evaluada. Si se usa CA-125 como la medida del marcador tumoral, los resultados serán evaluados con los lineamientos de consenso del Gynecologic Cancer Intergroup (GCIG). Si se usa PSA como la medida del marcador tumoral, los resultados serán evaluados con los lineamientos de consenso del Prostate Cancer Working Group (PCWG).

[00286] Biomarcadores tumorales séricos (Activina A, FSH, estradiol, testosterona)

[00287] Como el STM 434 inhibe la señalización de activina, determinaremos si los niveles séricos de activina son un biomarcador farmacodinámico que refleja la medida de la inhibición objetivo por STM 434. Como las activinas son parte de un mecanismo de retroalimentación endocrino que estimula la liberación de FSH y las hormonas sexuales (estradiol, testosterona), estos biomarcadores endocrinos también serán evaluados como biomarcadores de eficacia farmacodinámica potenciales.

[00288] La determinación de la activina A será realizada por el laboratorio central para asegurar la comparabilidad entre sujetos. El FSH, el estradiol y la testosterona serán evaluados por laboratorios locales. Las instrucciones para la manipulación de la muestra se proveen en el Manual de Laboratorio.

[00289] Biomarcadores tumorales tisulares

[00290] Se examinarán secciones de tumores incorporados en parafina fijada con formalina para determinar la señalización autocrina/paracrina midiendo el mRNA para el receptor

ACVR2B y el ligando INHBA (todos los sujetos) en la selección y en la visita del Ciclo 4 Día 1 usando un ensayo RNAScope® validado. El estado de mutación del gen FOXL2 (para los sujetos con tumores de las células de la granulosa) será determinado por secuenciación de ADN en la selección. El estado de mutación del gen ARID1A será determinado por secuenciación de la generación siguiente, comparando el ADN tumoral con el ADN somático de la sangre entera (para los sujetos con tumores de las células claras/endometriales); este ensayo también puede determinar la secuencia de otros genes de cáncer presentes en el microchip. Como aún no se ha establecido la relevancia clínica de estos datos, los sujetos no serán informados de los resultados de los análisis de mutación. Muestras (secciones de tejido o bloques de tumores) serán enviados al laboratorio central de acuerdo con las instrucciones en el Manual de Laboratorio.

[00291] Células tumorales circulantes

[00292] La señalización de activina es necesaria para mantener a las poblaciones de células madres de cáncer en algunos tipos de tumores. Por lo tanto, niveles reducidos de CTCs pueden reflejar la actividad farmacodinámica de STM 434. En este estudio, las CTCs serán enumeradas usando la plataforma de CellSearch® validada en la selección y en el Ciclo 2 Día 1. Las muestras serán enviadas al laboratorio central de acuerdo con las instrucciones en el Manual de Laboratorio.

[00293] Lípidos séricos

[00294] Como la farmacología anti-activina y anti-miostatina de STM 434 puede llevar a una masa muscular aumentada, determinaremos si los niveles de lípidos séricos son afectados en los sujetos tratados.

[00295] Glucosa e insulina sérica en ayunas y por la evaluación del modelo homeostático

[00296] La resistencia a la insulina (IR) y la hiperglucemia son factores de riesgo para el desarrollo de complicaciones cardiovasculares. En estudios preclínicos, el sustituto de STM 434, STM 217, mejoró la IR. Si bien el pinzamiento (“clamp”) de glucosa euglicémico hiperinsulinémico es el estándar de oro para medir la IR, la complejidad de este método limita su uso. Un método más práctico, HOMA, que usa niveles en ayunas de glucosa e insulina, ha sido estudiado en sujetos con diálisis. Las mediciones obtenidas con HOMA se correlacionan bien con las obtenidas usando el pinzamiento de glucosa euglicémico hiperinsulinémico.

[00297] El HbA1c es recomendado por la American Diabetes Association para la evaluación del control glucémico. La evaluación de HbA1c en este estudio complementa las

pruebas de glucosa en ayunas e insulina en ayunas y proporcionará una medición integrada del control de glucosa en el tiempo.

[00298] ANÁLISIS ESTADÍSTICO

[00299] Variables de evaluación

[00300] Primarias

[00301] Las variables de evaluación primarias son como sigue:

- Parte 1: La MTD de la monoterapia con STM 434 en sujetos con cáncer ovárico u otro tumor sólido avanzado
- Parte 2: La incidencia de AEs y cambios clínicamente significativos en pruebas de laboratorio, ECGs, y signos vitales en sujetos con tumores ováricos / de las trompas de Falopio / peritoneal primario /endometriales
- Parte 3: La MTD de STM 434 administrado en combinación con quimioterapia con doxorubicina liposomal en sujetos con cáncer ovárico / de las trompas de Falopio / peritoneal primario

[00302] Secundarias

[00303] Las variables de evaluación secundarias (Partes 1, 2, y 3, a menos que se indique de otra manera) incluyen las siguientes:

- La RP2D en el caso de que no haya una MTD (Partes 1 y 3)
- La incidencia de AEs y cambios clínicamente significativos en las pruebas de laboratorio, ECGs y signos vitales (Partes 1 y 3)
- La incidencia de la formación de anticuerpos STM 434
- Perfiles PK de STM 434
- Perfiles PK de doxorubicina/doxorrubicinol (Parte 3)
- Respuestas de los sujetos en el cuestionario de neuropatía FACT–NTX
- Proporción de respuesta radiográfica (rRR)
- Duración de la respuesta radiográfica (dRR)
- Supervivencia libre de avance radiográfica (rPFS)
- Proporción de respuesta al marcador tumoral (TMRR)
- Tiempo hasta el avance del marcador tumoral (TTTMP)
- Correlación entre las concentraciones séricas de línea de base y n–tratamiento con activina A, niveles tumorales de mRNA para INHBA/ACVR2B, y estado de mutación del tumor (en sujetos con tumores de las células claras / endometriales / de las células de la granulosa) a las medidas de eficacia antitumoral
- Cambio de la línea de base en la masa corporal magra, la masa apendicular magra, masa grasa (visceral y subcutánea), perfiles lipídicos, glucosa en ayunas, insulina en ayunas, HOMA, HbA1c, y distancia de caminata de 6 minutos

[00304] Exploratorias

[00305] Las variables de evaluación exploratorias (Partes 1, 2, y 3) son como sigue:

- Correlación entre los parámetros PK y la eficacia antitumoral, la densidad mineral ósea (en sujetos sin metástasis ósea), perfiles lipídicos, glucosa en ayunas, insulina en ayunas, HbA1c, distancia de caminata de 6 minutos, formación de anticuerpos anti-fármaco, biomarcadores o datos de ECG.

[00306] Análisis de poblaciones

[00307] Los análisis de poblaciones con respecto a la eficacia, seguridad y PK, respectivamente, se describen a continuación.

- El análisis de población con respecto a la eficacia incluirá todos los sujetos que reciben al menos durante 4 semanas la administración de STM 434. Un análisis secundario de las variables de evaluación de la eficacia serán realizados para todos los sujetos que reciben durante al menos 12 semanas la administración de STM 434.
- El análisis de población con respecto a la seguridad incluirá todos los sujetos que reciben al menos 1 dosis de STM 434.
- El análisis de población de PK incluirá todos los sujetos que reciben al menos 1 dosis de STM 434 y que proporcionaron al menos 1 muestra de PK.

[00308] Análisis de la eficacia

[00309] Los rRR, dRR y rPFS serán definidos de acuerdo con los criterios de RECIST 1.1 y analizados usando estadística descriptiva y métodos de Kaplan–Meier. Para rPFS, los sujetos que no experimentan avance de la enfermedad o muerte serán censados a la fecha de su última exploración por imágenes para la evaluación de la enfermedad.

[00310] Los TMRR y TTTMP serán definidos por lineamientos de consenso apropiados, y analizados usando estadística descriptiva y métodos de Kaplan–Meier.

[00311] Análisis farmacocinético

[00312] Los parámetros PK de STM 434 sólo y en combinación con doxorubicina liposomal serán estimados usando métodos PK no compartimentales estándar y resumidos usando estadística descriptiva (medios, desviaciones estándar, medianas, mínima y máxima).

[00313] Los análisis exploratorios que correlacionan la exposición a la eficacia antitumoral, peso corporal magro, masa grasa, perfiles lipídicos, glucosa en ayunas, insulina en ayunas, HOMA, HbA1c, 6MWT, formación de anticuerpos anti-fármaco, biomarcadores o datos de ECG pueden ser realizados *ad hoc* o *post hoc*.

[00314] Análisis de seguridad

[00315] Las evaluaciones de seguridad incluirán AEs, medicaciones concomitantes, resultados de laboratorio y signos vitales. Todos los AEs reportados serán codificados usando el Medical Dictionary for Regulatory Activities, resumidos por número y porcentaje de sujetos con AEs, y atribución (serios versus no serios y relación reportada por el investigador [no relacionado, posiblemente relacionado, relacionado]). Sólo los AEs que ocurren después de la iniciación de la primera dosis de tratamiento hasta los 30 días después del último tratamiento serán incluidos en las tablas. La incidencia de la formación de anticuerpos anti–STM 434 será resumida usando estadística descriptiva.

[00316] Determinación del tamaño de la muestra

[00317] El estudio está planificado para enrolar hasta un total de 66 sujetos (que consisten en hasta 30 sujetos en la Parte 1, 24 sujetos en la Parte 2, y hasta 12 sujetos en la Parte 3). Este tamaño de muestra no está basado en cálculos de potencia, sino más bien en la evaluación clínica y la expectativa de que se cumplirán los objetivos del estudio con el tamaño de muestra planificado.

[00318] Para la Parte 2 del estudio, en la cohorte para los subtipos raros de cáncer ovárico de las células claras y los tumores de las células de la granulosa, sólo se enrolarán 6 sujetos de cada subtipo debido al pequeño número de sujetos que se esperan en los sitios del ensayo clínico, mientras que la cohorte para los tumores ováricos serosos más comunes enrolarán 12 sujetos.

Conclusión

[00319] El STM 434 formulado administrado como monoterapia o en combinación con quimioterapia con doxorubicina liposomal trata el cáncer ovárico y otros tumores sólidos con efectos colaterales relativamente limitados en sujetos seleccionados.

Tabla 16: Procedimientos del estudio							
Evaluación	Selección		Fase de tratamiento				Final del estudio²
			Ciclo 1		Ciclos 2, 3, 5, 6.	Ciclos 4, 7, 10.	
	Días –14 a 1	Día –1	Día 1	Día 15	Día 1	Día 1 y en la discontinuación del tratamiento¹	
Formulario de consentimiento firmado	X						

Tabla 16: Procedimientos del estudio							
Evaluación	Selección		Fase de tratamiento				Final del estudio²
			Ciclo 1		Ciclos 2, 3, 5, 6.	Ciclos 4, 7, 10.	
	Días -14 a 1	Día -1	Día 1	Día 15	Día 1	Día 1 y en la discontinuación del tratamiento¹	
Historia clínica, demografía, terapias de cáncer previas	X						
Examen físico, altura y peso ³	X	X ⁴		X	X	X	X
Examen de guayacol en heces	X ⁵						
Signos vitales ⁶	X	X ⁴		X	X	X	X
ECOG	X	X ⁴		X	X	X	X
ECG ⁷	X	X			X	X	X
FACT/GOG-NTX ⁸	X			X	X	X	X
MUGA o ECHO	X ⁹					X ⁹	X ⁹
Administración de STM 434			X		X	X	
Administración de la dosis de doxorubicina liposomal ¹⁰			X		X	X	
Medicaciones concomitantes	X		X	X	X	X	X
Eventos adversos	X ¹¹		X	X	X	X	X ¹²
Hematología	X	X ⁴		X	X	X	X
Panel de coagulación (PT, PTT, INR, TT ¹³ , D-dímero ¹³)	X	X ⁴		X	X	X	X
Química sérica	X	X ⁴		X	X	X	X

Tabla 16: Procedimientos del estudio							
Evaluación	Selección		Fase de tratamiento				Final del estudio ²
			Ciclo 1		Ciclos 2, 3, 5, 6.	Ciclos 4, 7, 10.	
	Días -14 a 1	Día -1	Día 1	Día 15	Día 1	Día 1 y en la discontinuación del tratamiento ¹	
Glucosa en ayunas e insulina en ayunas	X					X	
HbA1c ¹⁴	X					X ¹⁴	X
Lípidos séricos	X					X	X
Biomarcadores tumorales séricos ¹⁵	X	X ⁴			X	X	X
Biomarcadores tumorales tisulares ¹⁶	X						
Análisis de orina (tira reactiva)	X						
Test de embarazo en sangre	X						
Activina A (libre y total)	X	X ⁴		X	X	X	X
CTCs	X ¹⁷				X ¹⁷		
FSH, estradiol (sujetos femeninos), testosterona (sujetos masculinos)	X	X ⁴		X	X	X	X
DXA de laboratorio central	X ¹⁸					X ¹⁹	
Test de caminata de 6 minutos	X				X ²⁰	X	
CT/MRI	X ¹⁸					X ¹⁹	

Tabla 16: Procedimientos del estudio							
Evaluación	Selección		Fase de tratamiento				Final del estudio ²
			Ciclo 1		Ciclos 2, 3, 5, 6.	Ciclos 4, 7, 10.	
	Días -14 a 1	Día -1	Día 1	Día 15	Día 1	Día 1 y en la discontinuación del tratamiento ¹	
Exploración ósea ²¹	X ¹⁸					X ¹⁹	
Evaluación del avance de la enfermedad						X	
Anticuerpo anti-STM 434	X	X ⁴			X	X	X
PK predosis			X ²²		X ²²	X ²²	
PK postdosis			X ²²	X	X ²²		
¹ La visita de discontinuación del tratamiento puede ocurrir en cualquier visita programada o no programada cuando sea apropiado. En esta visita, se determina la documentación para confirmar el avance de la enfermedad o una toxicidad inaceptable. ² La visita de EOS está programada 28 días después de la última administración de STM 434. ³ El peso del sujeto se registra en cada visita; la altura se registra en la visita de la selección. ⁴ Los procedimientos programados para el Día -1, con excepción del monitor Holter de ECG, pueden ser realizados antes de la administración de la dosis el Día 1 de Ciclo 1. ⁵ La prueba de guayacol en las heces se realiza en la selección y puede ser repetida a discreción del investigador poslínea de base. ⁶ Signos vitales: temperatura aural, transdérmica u oral, presión sanguínea sentado, frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria ⁷ Después de la visita de la selección, deben recogerse los ECGs usando equipamiento del laboratorio central. Partiendo del Día -1 los sujetos llevan un monitor Holter continuamente hasta la visita del Día 2. Subsiguientemente, se obtendrán ECGs de 12 derivaciones con la máquina del laboratorio central. ⁸ Los FACT/GOG-NTX pueden ser recogidos en visitas no programadas si se necesitan para evaluar un AE de neuropatía. ⁹ Sólo los sujetos en la Parte 3 usan MUGA o ECHO para documentar la fracción de eyección cardíaca para la administración de doxorubicina liposomal. La elección de MUGA o ECHO es a discreción del investigador, pero una vez que se seleccionó la modalidad, debería usarse el mismo método para el sujeto durante todo el período del estudio. Debe realizarse MUGA/ECHO en la selección y en el Ciclo 4 Día 1. En el caso de que el sujeto tratado con doxorubicina en la Parte 3 discontinúe antes del Ciclo 4 Día 1, se realizará un MUGA/ECHO							

Tabla 16: Procedimientos del estudio							
Evaluación	Selección		Fase de tratamiento				Final del estudio ²
			Ciclo 1		Ciclos 2, 3, 5, 6.	Ciclos 4, 7, 10.	
	Días -14 a 1	Día -1	Día 1	Día 15	Día 1	Día 1 y en la discontinuación del tratamiento ¹	
en la visita EOS.							
¹⁰ La administración de doxorrubicina liposomal es para los sujetos en la Parte 3 del estudio.							
¹¹ SAEs pretratamiento son reportados desde el tiempo que se firmó el documento de consentimiento informado hasta la administración de la medicación en estudio en el Ciclo 1 Día 1.							
¹² Seguimiento de AE de 30 días después de la última administración de STM 434 para determinar si hay cualquier AEs o SAEs nuevo o regular independientemente de la atribución de causalidad. El seguimiento puede ser realizado mediante el teléfono y es documentado en las notas de origen.							
¹³ Selección y Ciclo 2 Día 1.							
¹⁴ HbA1c será recogido y analizado en la selección, en el Ciclo 4 Día 1, en la discontinuación del tratamiento y en EOS solamente.							
¹⁵ Los biomarcadores tumorales séricos pueden incluir CA-125, PSA, CA 19-9, CEA, u otros biomarcadores según sea apropiado en base al sujeto							
¹⁶ Los biomarcadores tumorales tisulares incluyen secciones del tumor/bloques del tumor para expresión del gen ACVR2B e INHBA (todos los sujetos) así como también el estado de mutación del gen (para sujetos con tumores de las células claras / endometriales / células de la granulosa).							
¹⁷ CTCs serán recogidos en la selección y en el Ciclo 2 Día 1.							
¹⁸ Las exploraciones (DXA, CT, MRI, ósea) realizadas hasta 30 días antes del Ciclo 1 Día 1 se pueden usar para las evaluaciones de la línea de base. Un MRI del cerebro se usa para excluir cualquier metástasis del cerebro.							
¹⁹ Las exploración en el estudio de DXA, CT/MRI y óseas se pueden realizar dentro de ± 8 días de la visita del Día 1.							
²⁰ La prueba de la caminata de 6 minutos será completada en la visita del Ciclo 2 Día 1.							
²¹ Las evaluaciones de la exploración ósea pueden ser realizadas para los sujetos con tumores metastásicos en el hueso.							
²² El programa detallado para las evaluaciones PK se presenta en la presente.							

Ejemplo 5: Resultados en el ínterin para el estudio de STM 434.

[00320] Se seleccionaron tres sujetos humanos para el tratamiento con STM 434 usando el protocolo arriba mencionado. Cada sujeto tenía una forma avanzada de cáncer: ovárico seroso, ovárico de la granulosa o de colon. El sujeto 1 tenía un cáncer ovárico seroso, el Sujeto 2 tenía un cáncer ovárico de las células de la granulosa, y el Sujeto 3 tenía un cáncer de colon. El Sujeto 1 tenía un diagnóstico de cáncer ovárico con Estadio IV en enero de 2014. Presentaba un avance del tumor de adenocarcinoma seroso después de haber recibido carboplatino y paclitaxel previamente en 2014. El Sujeto 2 tenía un diagnóstico de cáncer ovárico en 1998 y presentaba un avance del tumor de las células de la granulosa después de haber recibido quimioterapia con cisplatino, etopósido, bleomicina en 2010, carboplatino y paclitaxel en 2012, bevacizumab, medroxiprogesterona, anastrozol en 2013, y RX-3117 (un análogo de citidina en investigación) en 2014. El Sujeto 3 tenía un diagnóstico de cáncer de colon en Estadio IV colon cancer in June 2012. Presentaba un avance del tumor del colon después de haber recibido antes quimioterapia con 5-fluorouracilo, leucovorina, oxaliplatino en 2012, irinotecán, 5-fluorouracilo, leucovorina, bevacizumab en 2013 y panitumumab en 2014.

[00321] Formulación de STM 434, envasado y almacenamiento

[00322] El STM 434 fue formulado como una solución acuosa estéril prevista para la administración IV, conteniendo 70 mg/mL de STM 434, tampón fosfato de potasio 10 mM, 8,8% (p/v) de sacarosa y 0,006% (p/v) de polisorbato 20 a pH 6,7. La solución formulada de STM 434 fue envasada en viales de vidrio de 5 mL, con tapones de fluoropolímero de 13 mm y sellos de 13 mm. Los viales de STM 434 fueron almacenados en un freezer sin sistema antiestática a una temperatura de -20°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$). Antes del uso, el STM 434 fue descongelado durante la noche en un refrigerador a 2°C a 8°C .

[00323] Administración de STM 434

[00324] El STM 434 fue administrado a cada sujeto a 0,25 mg/kg IV aproximadamente cada 4 semanas. El Sujeto 1 comenzó con la terapia el 17 de octubre de 2014, y recibió dos dosis adicionales el 14 de noviembre de 2014 y el 15 de diciembre de 2014, antes de discontinuar el tratamiento del estudio el 30 de diciembre 2014. El Sujeto 2 comenzó con la terapia el 29 de octubre de 2014, y recibió tres dosis adicionales el 24 de noviembre de 2014, el 24 de diciembre de 2014, y el 21 de enero de 2015 – este sujeto continúa recibiendo el STM 434 hasta el 17 de febrero de 2015, el Sujeto 3 comenzó con la terapia el 6 de noviembre de 2014, y recibió una dosis adicional el 4 de diciembre de 2014, antes de discontinuar el tratamiento del estudio el 05 de enero de 2015.

[00325] Seguridad y eficacia del STM 434 en humanos

[00326] No se observaron eventos adversos que se consideraran relacionados con la administración del STM 434 en ningún sujeto. No se observaron eventos adversos relacionados con neuropatía, eventos hemorrágicos o síntomas endocrinos en ningún sujeto. No se observaron anticuerpos anti–STM 434 en ningún sujeto. El Sujeto 1 informó mejor apetito, energía y aumento del estado de actividad. Los investigadores consideraron que STM 434 era seguro y bien tolerado. Los investigadores recomendaron un aumento al siguiente nivel de dosis.

[00327] Inhibición por STM 434 de activina *in vivo*

[00328] Como las activinas son parte de un mecanismo de retroalimentación endocrino que estimula la liberación de FSH, se evaluó la FSH como un biomarcador de eficacia farmacodinámica potencial. Se espera que una reducción de la FSH sea indicativa de la inhibición de activina por STM 434.

[00329] La FSH fue evaluada usando el inmunoensayo cuantitativo ELISA. Se determinó que los niveles de FSH disminuyeron en 2 de 3 sujetos después de la administración de STM 434 a una dosis de 0,25 mg/kg. Figura 4. El cambio en porcentaje de la línea de base está representado en el eje y, en función del tiempo representado en el eje x; C1D1 indica Ciclo 1 Día 1 (línea de base antes del tratamiento), C1D15 indica Ciclo 1 Día 15, 14 días después de la administración inicial de STM 434 y C2D1 indica Ciclo 2 Día 1 (predosis, antes de la segunda administración de la dosis de STM 434, 4 semanas después de la primera administración). Una reducción de la FSH observada el C1D15 indica que el STM 434 inhibe la señalización de activina en los humanos. Los niveles de FSH vuelven aproximadamente a la línea de base, indicando que se requiere una nueva dosis de STM 434 para volver a suprimir la señalización de activina en humanos. Estos resultados indican que el STM 434 puede inhibir la activina en humanos.

[00330] Resultados PK de STM 434

[00331] Se determinó la PK por el inmunoensayo cuantitativo ELISA. El análisis de la PK intermedio mostró una depuración 2 veces mayor y un $T_{1/2}$ de 111, 114 ó 147 horas (4–5 días) comparado con datos previos que mostraban 163–259 horas (7–11 días) en monos. Figura 5. Esto sugiere que los sujetos pueden beneficiarse de un esquema de dosificación más frecuente de STM 434, por ejemplo, IV cada 2 semanas o cada 3 semanas.

[00332] Infarto tumoral inducido por STM 434

[00333] A un sujeto (Sujeto 2) que tenía un tumor de la granulosa se le realizó una exploración CT en la línea de base y nuevamente al comienzo del ciclo 4 (día 1). Había 12 semanas, y tres dosis entre las dos exploraciones. La Figura 6 muestra la exploración en la línea de base con el tumor indicado en el círculo. La Figura 7 muestra la exploración de seguimiento tomada al comienzo del ciclo 4, con el tumor indicado nuevamente en el círculo. Como se puede ver por comparación de las exploraciones, el tumor ha sufrido un infarto sustancial. Esto indica que una baja dosis de STM 434 es efectiva para tratar a un sujeto que tiene un tumor de la granulosa.

Ejemplo 6: Protocolo de STM 434 modificado.

[00334] En base, al menos en parte, en los resultados del Ejemplo 5, el protocolo de STM 434 del Ejemplo 4 fue modificado. El protocolo modificado se presenta más abajo en la Tabla 17, sus sub-tablas, y los apéndices asociados.

Tabla 17	
Sección	Descripción del cambio (tachado = texto eliminado; rojo = texto nuevo)
Sinopsis	Diseño del estudio: <u>Parte 1</u> es un estudio de aumento de la dosis, de etiqueta abierta, que incorpora un diseño de 3+3 en sujetos con tumores sólidos avanzados. Un total de hasta 39 sujetos serán enrolados para evaluar la seguridad, tolerancia y los perfiles PK de STM 434 intravenoso (IV) a 5 niveles de dosis planificados (0,25 mg/kg IV, 0,5 mg/kg IV, 1 mg/kg IV, 2 mg/kg IV, y 4 mg/kg IV). En ausencia de una señal de seguridad durante la ventana de evaluación de la toxicidad que limita la dosis (DLT), el STM 434 se aumentará en los incrementos de dosis de 100% planificados, como se indica en la tabla más abajo. Si se observa una señal de seguridad (≥ 2 AEs Grado 2 relacionados con STM 434 clínicamente significativos o una toxicidad Grado 3 relacionada con STM 434), todos los otros aumentos de dosis entre cohortes se realizarán con incrementos de dosis $\leq 50\%$ y un nivel o niveles de dosis apropiados adicionales podrán estudiarse para evitar una toxicidad excesiva. Cada nivel de dosis será evaluado secuencialmente, y cada cohorte de dosis incluirá 3–6 sujetos (el número dependerá de que se observen DLTs). Para asegurar un número adecuado de sujetos evaluables, se pueden enrolar hasta 4 sujetos por cohorte aun en ausencia de una DLT. Si bien se evalúa la seguridad en una cohorte de dosis mayor que está cerrada a la inclusión, se puede incluir un sujeto adicional en la cohorte de mayor dosis que el comité de seguridad ha declarado previamente que era segura y bien tolerada, si hay una evidencia preliminar durante la conducción del estudio de que el STM 434 puede proveer actividad antitumoral para su tipo de tumor (por ejemplo, tumor de las células de la granulosa). En base a los datos de la Cohorte 1, que mostraron una vida media más corta y una mayor depuración en comparación con los valores predichos que están basados en datos PK de estudios preclínicos, el STM 434 administrado una vez

cada 2 semanas (Q2W) o una vez cada 3 semanas (Q3W), en lugar de una vez cada 4 semanas (Q4W), puede optimizar la exposición. Durante la Parte 1, si los datos PK de la Cohorte 2 (0.5 mg/kg IV Q4W) confirman las observaciones de la vida media hechas en la Cohorte 1 (0,25 mg/kg IV Q4W), y si el STM 434 es seguro y bien tolerado en la Cohorte 2, la dosificación del STM 434 Q4W (Esquema A) se cambiará a Q2W (Esquema B).

En el caso de que haya un cambio en el esquema, se repetirá el mismo nivel de dosis en la cohorte siguiente. Por ejemplo, si se tomó la decisión de aumentar la frecuencia de la dosis siguiente a la Cohorte 2, 0,5 mg/kg Q4W, la siguiente cohorte a ser evaluada será la Cohorte 3, 0,5 mg/kg Q2W. Luego, se incluirán las cohortes subsiguientes en el nuevo esquema Q2W a menos que el comité de revisión de la seguridad recomiende disminuir la dosis a una dosificación menos frecuente en respuesta a los datos de seguridad. Para la disminución de la dosis, se realizará en forma concurrente la inclusión de las cohortes que evalúan el Q3W (Esquema C) y el Q4W (Esquema A) al mismo nivel de dosis, a menos que el comité de seguridad recomiende evaluar sólo el Q4W (Esquema A).

Las cohortes de dosis planificadas en la Parte 1 son como sigue:

	Esquema A	Esquema B	Esquema C
Cohorte 1	0,25 mg/kg de STM 434 IV Q4W	0,25 mg/kg de STM 434 IV Q2W	0,25 mg/kg de STM 434 IV Q3W
Cohorte 2	0,5 mg/kg de STM 434 IV Q4W	0,5 mg/kg de STM 434 IV Q2W	0,5 mg/kg de STM 434 IV Q3W
Cohorte 3	1 mg/kg de STM 434 IV Q4W	1 mg/kg de STM 434 IV Q2W	1 mg/kg de STM 434 IV Q3W
Cohorte 4	2 mg/kg de STM 434 IV Q4W	2 mg/kg de STM 434 IV Q2W	2 mg/kg de STM 434 IV Q3W
Cohorte 5	4 mg/kg de STM 434 IV Q4W	4 mg/kg de STM 434 IV Q2W	4 mg/kg de STM 434 IV Q3W

El aumento de la dosis de una cohorte a la siguiente será determinado por el auspiciante junto con los investigadores y se basará en AEs provenientes del tratamiento datos clínicos de laboratorio, hallazgos del examen físico; incluyendo signos vitales, ECGs, y datos PK disponibles después que todos los sujetos dentro de una cohorte hayan completado 28 días de tratamiento (o 21 días si siguen el Esquema C [Q3W]). El aumento de la dosis se realizará si la incidencia en el sujeto de las DLTs o los AEs serios relacionados con STM 434 (SAEs) durante los primeros 28 días (o 21 días si se sigue el Esquema C [Q3W]) de tratamiento del estudio es < 33%.

En una cohorte dada, si ninguno de los sujetos experimenta una DLT durante los

	primeros 28 días (o los primeros 21 días, si se evalúa el Esquema C [Q3W]) después de la administración inicial de STM 434, entonces se realizará un aumento de la dosis, y 3 sujetos serán incluidos en la cohorte en el siguiente nivel de dosis. Sin embargo, si se observan ≥ 2 AEs relacionados con STM 434 Grado 2 clínicamente significativos o un AE Grado 3 relacionado con STM 434 (una señal de seguridad), todos los aumentos de dosis serán reducidos a incrementos de dosis $\leq 50\%$. En el caso de que se observe una señal de seguridad, se proporcionará un informe del estudio comunicando el o los niveles de dosis revisados y se proporcionará el esquema a todos los sitios e IRBs especificando esta información para cada cohorte subsiguiente. Si 1 de los 3 ó 4 sujetos iniciales en una cohorte experimenta una DLT, 3 (o 2, si se incluyeron inicialmente 4) sujetos adicionales serán incluidos en el mismo nivel de dosis. Si sólo 1 de 6 sujetos dentro de una cohorte experimenta una DLT o un SAE relacionado con STM 434 durante los primeros 28 días de tratamiento (o los primeros 21 días si se evalúa el Esquema C [Q3W]), la siguiente cohorte puede comenzar con la inclusión. Si se observa una DLT, se reducirán todos los otros aumentos de dosis a incrementos de dosis $\leq 50\%$. Si 2 o más de los 6 sujetos dentro de una cohorte experimentan una DLT o un SAE relacionado con STM 434 durante los primeros 28 días de tratamiento (o 21 días si se evalúa el Esquema C [Q3W]), esta dosis será considerada la dosis tóxica. El aumento de la dosis puede seguir a una dosis menor o un esquema menos frecuente en base a la toxicidad emergente, la PK o los datos PD, hasta que se determina la MTD. Dosis > 4 mg/kg pueden ser exploradas si los datos PK observados están por debajo de los niveles predichos. <u>Parte 2</u> es un estudio de etiqueta abierta, diseñado para obtener seguridad adicional y datos de eficacia exploratorios en sujetos con tumores avanzados de las células claras ováricos/endometriales, de la granulosa, y tumores serosos ováricos/de las trompas de Falopio/ peritoneales primarios. Un total de 24 sujetos serán incluidos en esta parte del estudio; 6 sujetos tienen adenocarcinoma de las células claras ováricos/endometriales, 6 sujetos tienen tumores de las células de la granulosa y 12 sujetos tienen tumores serosos. Todos los sujetos recibirán STM 434 IV a la RP2D usando el esquema recomendado después de la revisión de los datos del aumento de la dosis en la Parte 1 del estudio. Un informe del estudio comunicando esta información será enviado a todos los sitios e IRBs para las cohortes de expansión de la Parte 2. La inclusión en la Parte 2 depende de la determinación de la RP2D en la Parte 1. Las cohortes planificadas en la Parte 2 son como sigue: • Cohorte 6: STM 434 a la RP2D IV a 6 sujetos con adenocarcinoma de las células claras y a 6 sujetos tumores de las células de la granulosa • Cohorte 7: STM 434 a la RP2D IV en 12 sujetos con tumores serosos <u>Parte 3</u> es un estudio de aumento de la dosis, de etiqueta abierta, de STM 434 en combinación con quimioterapia con doxorubicina liposomal incorporando un diseño de 3+3 en sujetos con cáncer ovárico / de las trompas de Falopio / peritoneal primario que recibieron antes un tratamiento con un régimen de quimioterapia a base de platino o que no podían recibir quimioterapia a base de platino. Después que se completó la Parte 1 y se determinó la RP2D y la frecuencia de la dosificación, 6–12 sujetos serán incluidos en la Parte 3. Un informe del estudio comunicando la dosis de STM 434 y la información del esquema será proporcionado a todos los sitios e IRBs para las cohortes de
--	--

	combinación con quimioterapia de la Parte 3. Como la doxorrubicina liposomal es administrada Q4W en este protocolo, en el caso de que la frecuencia de la dosis de STM 434 recomendada determinada en la Parte 1 es Q3W, se puede usar en la Parte 3 una dosis Q4W de la que se predice que produce una exposición PK similar. Las Partes 2 y 3 incluirán sujetos en forma concurrente. Las cohortes planificadas en la Parte 3 son como sigue: • Cohorte 8: STM 434 a un nivel de dosis menor que la RP2D IV + doxorrubicina liposomal (40 mg/m² IV) Q4W) • Cohorte 9: STM 434 a la RP2D IV + doxorrubicina liposomal (40 mg/m² IV) Q4W) El aumento de la dosis de la Cohorte 8 a la Cohorte 9 será determinado por el auspiciante junto con los investigadores y se basará en los AEs causados por el tratamiento, datos clínicos de laboratorio, hallazgos del examen físico incluyendo los signos vitales, ECGs, y datos PK disponibles después que los 3 sujetos dentro de la cohorte hayan completado 28 días de terapia usando el diseño de 3+3 indicado para la Parte 1. En el caso de que la combinación de la dosis inicial en la Cohorte 8 no sea segura y bien tolerada, el comité de seguridad puede recomendar evaluar una dosis menor de STM 434 en combinación con quimioterapia en una cohorte adicional. <u>Reemplazo del sujeto:</u> En la Parte 1, si un sujeto se retira de una cohorte por cualquier razón distinta de una DLT antes de completar los 28 días de tratamiento con STM 434 (o antes de completar 21 días si se evalúa el Esquema C [Q3W]), se agregará un sujeto de reemplazo a la cohorte hasta que 3 sujetos por cohorte completen los 28 días de tratamiento con STM 434 (o 21 días si se evalúa el Esquema C [Q3W]). En la Parte 2, una vez que los sujetos son incluidos en el estudio, no serán reemplazados por ninguna razón. En la Parte 3, si un sujeto se retira por cualquier razón distinta de una DLT antes de completar los 28 días de tratamiento con STM 434 y doxorrubicina liposomal, se agregará un sujeto de reemplazo a la cohorte hasta que 3 sujetos por cohorte completen los 28 días de tratamiento con STM 434. <u>Definición de DLT:</u> Una DLT será definida como cualquier toxicidad relacionada Grado ≥ 3 (de acuerdo con la Common Terminology Criteria for Adverse Events [CTCAE], versión 4.03) no hematológica (excluyendo toxicidades no relacionadas), o cualquier toxicidad hematológica Grado ≥ 4 que dure 7 días, neutropenia febril, o trombocitopenia Grado 3 con hemorragia activa. Un sujeto que experimenta una DLT que desea retomar la terapia con una dosis reducida de STM 434 puede hacerlo a discreción del investigador cuando la toxicidad ha disminuido a CTCAE Grado ≤ 1 o los valores de la línea de base, y si el sujeto no ha experimentado un avance de la enfermedad. <u>Definición de MTD:</u> La MTD se define como el nivel de dosis más alto con una incidencia de DLT $< 33\%$ en los sujetos de la cohorte. <u>Definición de RP2D:</u> La RP2D se definirá considerando los datos de la MTD, la PK, el biomarcador farmacodinámico y la respuesta antitumoral. <u>Aumento de la dosis intrasujeto:</u> Si un sujeto no tiene evidencia de enfermedad progresiva radiográfica y no tuvo una DLT, se permitirá el aumento de la dosis intrasujeto al nivel evaluado en la cohorte de la dosis mayor que el comité de
--	---

	seguridad ha declarado previamente seguro y bien tolerado, y a la discreción del investigador. Cualesquiera planes para el aumento de la dosis intrasujeto requieren que el sujeto haya completado el período de evaluación de 28 días DLT (o el período de 21 días si se encuentran en el esquema de dosificación Q3W) y ha completado el cambio de estadio radiográfico del tumor poslínea de base. El aumento de la dosis intrasujeto tiene que ser discutido con el monitor médico. Población en estudio: Hasta un total de 75 sujetos con cáncer ovárico avanzado y otros tumores sólidos serán incluidos en los 3–6 sitios del estudio. De los 75 sujetos, hasta 39 sujetos serán incluidos en la Parte 1, 24 sujetos en la Parte 2, y hasta 12 sujetos en la Parte 3. Criterios de inclusión: 3. a. Sujetos con enfermedad metastásica recurrente o avanzada localmente considerados refractarios o que no toleran todos los tratamientos estándar disponibles para su tumor, o aquellos con tumores para los cuales no se encuentra disponible un tratamiento estándar O b. Sujetos con tumores serosos ováricos/ de las trompas de Falopio/ peritoneales primarios, tumores de las células de la granulosa o tumores de las células claras considerados refractarios/resistentes al platino, definidos como teniendo al menos un régimen quimioterapéutico a base de platino previo con un intervalo subsiguiente libre de platino de < 12 meses, que tuvieron un avance durante la terapia a base de platino, o que tienen una enfermedad persistente después de una terapia a base de platino, son elegibles. Sujetos que no toleran el platino, definidos como incapaces de recibir más platino debido a la toxicidad, son elegibles. 9. Para la Cohorte 6, los sujetos tienen que tener carcinoma de las células claras ovárico/ endometrial o tumores ováricos de las células de la granulosa refractarios/ resistentes/ que no toleran el platino (como se define en el criterio de inclusión #3b) 10. Para la Cohorte 7, los sujetos tienen que tener cáncer seroso ovárico /de las trompas de Falopio/ peritoneal primario refractario/ resistente/ que no tolera el platino (como se define en el criterio de inclusión #3b) 11. Para las Cohortes 8 y 9, los sujetos tienen que tener cáncer ovárico (de las trompas de Falopio / peritoneal primario avanzado refractario/ resistente/ que no tolera el platino (como se define en el criterio de inclusión #3b) Criterios de exclusión: 12. Sujetos con una creatinina > 1,5 × ULN y una depuración de creatinina estimada de < 60 mL/min (usando la ecuación de Cockcroft–Gault) 15. Terapia con anticuerpos/biológica dentro de 5 vidas medias o 4 semanas (según la que sea más prolongada) del Ciclo 1 Día 1 (Nota: una abstinencia de 6 semanas será aceptable para sujetos que recibían previamente bevacizumab) 20. Presencia de un dispositivo de shunt venoso portal o una historia de resección hepática amplia
--	--

	Producto de prueba, dosis y modo de administración: En la Parte 1, las dosis de inyección de STM 434 y las vías de administración planificadas son como sigue: 0,25 mg/kg IV, 0,5 mg/kg IV, 1 mg/kg IV, 2 mg/kg IV, y 4 mg/kg IV. El STM 434 será administrado Q2W, Q3W o Q4W, dependiendo de la PK y las observaciones de seguridad durante la Parte 1. En las Partes 2 y 3, los sujetos recibirán el STM 434 a la RP2D (establecida en la Parte 1) o un nivel de dosis menor que la RP2D. El STM 434 será administrado Q2W, Q3W o Q4W, dependiendo de la PK y las observaciones de seguridad durante la Parte 1. Además, los sujetos en la Parte 3 recibirán hasta 6 ciclos de doxorubicina liposomal (40 mg/m² Q4W); la modificación de la dosis y el ajuste para la doxorubicina liposomal seguirán la información de prescripción para este producto. Duración del tratamiento: La selección comenzará hasta 28 días antes de la dosificación (Ciclo 1 Día 1). Los sujetos en las Partes 1, 2, y 3 serán tratados con STM 434 hasta el avance de la enfermedad, a menos que se observe una toxicidad inaceptable. El avance de la enfermedad se basará en las mediciones radiográficas de acuerdo con los criterios de RECIST 1.1
1.1.2.3 Farma- cocinética clínica	La PK de STM 434 fue caracterizada en 3 sujetos con tumores sólidos avanzados en la Cohorte 1 del actual estudio, en el cual los sujetos recibieron 0,25 mg/kg IV cada 4 semanas (Q4W). Las concentraciones plasmáticas de STM 434 en función del tiempo para los 3 sujetos en la Cohorte 1 se discuten en el Ejemplo más arriba. Los resultados PK intermedios de estos sujetos mostraron que la depuración de STM 434 osciló desde aproximadamente 0,29 a 0,36 mL/h/kg, que era 2,5 veces mayor que lo esperado en base a los resultados PK en la especie preclínica. La vida media era similar entre los 3 sujetos en la Cohorte 1, con valores que oscilan entre 111 y 114 hasta 147 horas, que era sustancialmente más corto que los rangos observados en ratones (242 a 338 horas) y monos (163 a 259 horas). Si los resultados PK intermedios de la Cohorte 2 (0,5 mg/kg IV Q4W [Esquema A]) confirman una vida media similar a la observada para la Cohorte 1 (0,25 mg/kg IV Q4W [Esquema A]), se anticipa que la dosificación cambiará cada 2 semanas (Q2W; Esquema B en la Tabla 2 de la Sección 5.2.1; ver también Sección 3.1.1). Las cohortes subsiguientes serán evaluadas usando Q2W a menos que se observe toxicidad.
1.2 Razona- miento para la selección de la dosis de partida	La mayor dosis planificada en este estudio FIH es de 4,0 mg/kg, administrada IV Q2W. A esta dosis, la C_{max} y la AUC₀₋₃₃₆ humanas predicas son de 121,3 µg/mL y 12395 µg•h/mL, respectivamente, que son soportadas por márgenes de exposición de 1,8 y 4,9 veces con relación a la C_{max} y la AUC₀₋₃₃₆ a la dosis NOAEL en el estudio de toxicología de 4 semanas en monos y por márgenes de exposición de 0,7 y 1,1 veces con relación a la C_{max} y la AUC a la dosis STD10 en el estudio de toxicología de 4 semanas en ratones CD-1 (Tabla 1). Tabla 1. Márgenes de exposición estimados para el STM 434 después de la administración intravenosa de una dosis repetida (Q2W) a humanos en comparación con la exposición (AUC₀₋₃₃₆) a la administración subcutánea de una dosis repetida (QW) a ratones (15 mg/kg) y a monos Cynomolgus

	(10 mg/kg)						
	Dosis clínica (mg/kg, Q2W)	Farmacocinética humana		Márgenes basados en ratones (15 mg/kg) ^a		Márgenes basados en monos (10 mg/kg) ^b	
		AUC ₀₋₃₃₆ (µg•h/mL)	C _{max} (ng/mL)	AUC ₀₋₃₃₆ (µg•h/mL)	C _{max} (ng/mL)	AUC ₀₋₃₃₆ (µg•h/mL)	C _{max} (ng/mL)
	0,25	774,71	7580	18,1	10,4	78,7	28,8
	0,5	1549,42	15160	9,1	5,2	39,4	14,4
	1	3098,83	30321	4,5	2,6	19,7	7,2
	2	6197,66	60642	2,3	1,3	9,8	3,6
	4	12395,32	121285	1,1	0,7	4,9	1,8
	^a Como referencia, ratones que recibieron una dosis con 15 mg/kg de STM 434 tenían una AUC ₀₋₁₆₈ = 7030 µg•h/mL y C _{max} = 79,1 µg/mL						
^b Monos que recibieron una dosis de 15 mg/kg tenían los siguientes valores: AUC ₀₋₁₆₈ = 30500 µg•h/mL y C _{max} = 218 µg/mL							
3.1.1	La Parte 1 es un estudio de aumento de la dosis de etiqueta abierta que incorpora un diseño de 3+3 en sujetos con tumores sólidos avanzados. Un total de 39 sujetos serán incluidos en 5 cohortes de dosis secuenciales planificadas (cohortes 1 a 5; definidas en la Tabla 2) para evaluar la seguridad, tolerancia y perfiles PK de STM 434 IV a 5 niveles de dosis (0,25 mg/kg IV, 0,5 mg/kg IV, 1 mg/kg IV, 2 mg/kg IV y 4 mg/kg IV). En ausencia de una señal de seguridad durante la ventana de evaluación de la DLT, se aumentará el STM 434 en incrementos de dosis de 100% planificados. Si se observa una señal de seguridad (≥ 2 AEs Grado 2 relacionados con STM 434 clínicamente significativos o una toxicidad Grado 3 relacionada con STM 434), todos los aumentos de dosis ulteriores entre cohortes ocurrirán en incrementos de dosis ≤ 50% y se estudiará un nivel o niveles de dosis apropiados adicionales para evitar toxicidad excesiva. Cada nivel de dosis será evaluado secuencialmente, y cada cohorte de dosis consistirá en 3–6 sujetos (el número dependerá de si se observan DLTs).						
Parte 1 del estudio	Si bien se evalúa la seguridad en una cohorte de dosis mayor que está cerrada a la inclusión, se puede incluir un sujeto adicional en la cohorte de mayor dosis que el comité de seguridad ha declarado previamente que era segura y bien tolerada, si hay una evidencia preliminar durante la conducción del estudio de que el STM 434 puede proveer actividad antitumoral para su tipo de tumor (por ejemplo,						

	tumor de las células de la granulosa). En base a los datos PK de la Cohorte 1 (Sección 1.1.2.3), que mostraron una vida media más corta y una mayor depuración en comparación con los valores predichos que están basados en datos PK de estudios preclínicos, el STM 434 administrado Q2W o cada 3 semanas (Q3W), en lugar de Q4W, puede optimizar la exposición. Si los resultados PK intermedios de la Cohorte 2 (0,5 mg/kg IV Q4W [Esquema A]) confirman la vida media observada en la Cohorte 1 (0,25 mg/kg IV Q4W [Esquema A]), la dosificación en la Cohorte 3 será de 0,5 mg/kg IV Q2W (Esquema B), a menos que se observe toxicidad en el esquema de dosificación más frecuente. En el caso de que haya un cambio en el esquema, se repetirá el mismo nivel de dosis en la cohorte siguiente. Por ejemplo, si se tomó la decisión de aumentar la frecuencia de la dosis siguiente a la Cohorte 2, 0,5 mg/kg Q4W, la siguiente cohorte a ser evaluada será la Cohorte 3, 0,5 mg/kg Q2W. Luego, se incluirán las cohortes subsiguientes en el nuevo esquema Q2W a menos que el comité de revisión de la seguridad recomiende disminuir la dosis a una dosificación menos frecuente en respuesta a los datos de seguridad. Para la disminución de la dosis, se realizará en forma concurrente la inclusión de las cohortes que evalúan el Q3W (Esquema C) y el Q4W (Esquema A) al mismo nivel de dosis, a menos que el comité de seguridad recomiende evaluar sólo el Q4W (Esquema A). Un informe del estudio comunicando cualesquiera decisiones de cambio de esquema se proporcionará a todos los sitios y comisiones de revisión institucional (IRBs) especificando la dosis y la frecuencia de STM 434 a ser estudiadas en cada cohorte del protocolo. Los esquemas de dosificación para Q4W (Esquema A), Q2W (Esquema B), y Q3W (Esquema C) se definieron en la Tabla 2 (en la Sección 5.2.1). El aumento de la dosis de una cohorte a la siguiente será determinado por el auspiciante junto con los investigadores y se basará en AEs provenientes del tratamiento datos clínicos de laboratorio, hallazgos del examen físico; incluyendo signos vitales, ECGs, y datos PK disponibles después que los 3 sujetos dentro de una cohorte hayan completado 28 días de tratamiento (o 21 días si siguen el Esquema C [Q3W]). El aumento de la dosis se realizará si la incidencia en el sujeto de las DLTs o los AEs serios relacionados con STM 434 (SAEs) durante los primeros 28 días (o 21 días si se sigue el Esquema C [Q3W]) de tratamiento del estudio es < 33%. En una cohorte dada, si ninguno de los sujetos experimenta una DLT durante los primeros 28 días (durante los primeros 21 días, si se evalúa el Esquema C [Q3W]) después de la administración inicial de STM 434, entonces se realizará un aumento de la dosis, y 3 sujetos serán incluidos en la cohorte en el siguiente nivel de dosis. Sin embargo, si se observan ≥ 2 AEs relacionados con STM 434 Grado 2 clínicamente significativos o un AE Grado 3 relacionado con STM 434 (una señal de seguridad), todos los aumentos de dosis serán reducidos a incrementos de dosis $\leq 50\%$. En el caso de que se observe una señal de seguridad, se proporcionará un informe del estudio comunicando el o los niveles de dosis revisados y se proporcionará el esquema a todos los sitios e IRBs especificando esta información para cada cohorte subsiguiente. Si 1 de los 3 ó 4 sujetos iniciales en una cohorte experimenta una DLT, 3 (o 2, si se incluyeron inicialmente 4) sujetos adicionales
--	--

	serán incluidos en el mismo nivel de dosis. Si sólo 1 de 6 sujetos dentro de una cohorte experimenta una DLT o un SAE relacionado con STM 434 durante los primeros 28 días de tratamiento (o los primeros 21 días si se evalúa el Esquema C [Q3W]), la siguiente cohorte puede comenzar con la inclusión. Si se observa una DLT, se reducirán todos los otros aumentos de dosis a incrementos de dosis $\leq 50\%$. Si 2 o más de los 6 sujetos dentro de una cohorte experimentan una DLT o un SAE relacionado con STM 434 durante los primeros 28 días de tratamiento (durante los 21 días si se evalúa el Esquema C [Q3W]), esta dosis será considerada la dosis tóxica. El aumento de la dosis puede seguir a una dosis menor o un esquema menos frecuente en base a la toxicidad emergente, la PK o los datos PD, hasta que se determina la MTD. Dosis $> 4 \text{ mg/kg}$ pueden ser exploradas si los datos PK observados están por debajo de los niveles predichos.
3.1.2 Parte 2 del estudio	La Parte 2 es un estudio de etiqueta abierta, diseñado para obtener seguridad adicional y datos de eficacia exploratorios en sujetos con tumores avanzados de las células claras ováricas/endometriales, de la granulosa, y tumores serosos ováricos/de las trompas de Falopio/ peritoneales primarios. Un total de 24 sujetos serán incluidos en 2 cohortes en esta parte del estudio. Una cohorte (denominada Cohorte 6) incluirá 6 sujetos que tienen adenocarcinoma de las células claras ováricas/endometriales y 6 sujetos tienen tumores de las células de la granulosa; la segunda cohorte (Cohorte 7) incluirá 12 sujetos que tienen tumores serosos. Todos los sujetos recibirán STM 434 IV a la RP2D usando el esquema recomendado después de la revisión de los datos del aumento de la dosis en la Parte 1. Un informe del estudio comunicando esta información será enviado a todos los sitios y las IRBs para las cohortes de expansión de la Parte 2. La inclusión en la Parte 2 depende de la determinación de la RP2D en la Parte 1
3.1.3 Parte 3 del estudio	La Parte 3 es un estudio de aumento de la dosis, de etiqueta abierta, de STM 434 en combinación con quimioterapia con doxorubicina liposomal incorporando un diseño de 3+3 en sujetos con cáncer ovárico / de las trompas de Falopio / peritoneal primario que recibieron antes un tratamiento con un régimen de quimioterapia a base de platino o que no podían recibir quimioterapia a base de platino. Después que se completó la Parte 1 y se determinó la RP2D y la frecuencia de la dosificación, 6–12 sujetos serán incluidos en la Parte 3; las Partes 2 y 3 incluirán sujetos en forma concurrente. Un informe del estudio comunicando la dosis de STM 434 y la información del esquema será proporcionado a todos los sitios y las IRBs para las cohortes de combinación con quimioterapia de la Parte 3. Como la doxorubicina liposomal es administrada Q4W en este protocolo, en el caso de que la frecuencia de la dosis de STM 434 recomendada determinada en la Parte 1 es Q3W, se puede usar en la Parte 3 una dosis Q4W de la que se predice que produce una exposición PK similar. Los sujetos en la Parte 3 serán evaluados en 2 cohortes de dosis de 3–6 sujetos cada una (el número de sujetos por cohorte depende de que se observen DLTs o no). Una cohorte (denominada Cohorte 8) recibirá STM 434 a un nivel de dosis por debajo de la RP2D y la segunda cohorte (Cohorte 9) recibirá STM 434 a la RP2D; ambas cohortes recibirán doxorubicina liposomal a 40 mg/m^2.

	Los sujetos en ambas cohortes recibirán una infusión de doxorubicina liposomal antes de recibir el STM 434. Los estudios de laboratorio, incluyendo una exploración por adquisición multicerrada (MUGA) o un ecocardiograma (ECHO) serán evaluados en la línea de base y durante la administración de doxorubicina liposomal (ver Apéndice 1). Si se requiere, la reducción de la dosis de 40 mg/m² a 30 mg/m² debería ser implementada de acuerdo con los lineamientos de manejo de la toxicidad (ver Sección 5.3.2). Se evaluarán la seguridad, la tolerancia y los perfiles PK de STM 434 cuando se administre concomitantemente con doxorubicina liposomal. La dosis más baja de STM 434 (es decir, un nivel de dosis por debajo de la RP2D [Cohorte 8]) será evaluado primero. El aumento de la dosis será determinado por el auspiciante junto con los investigadores y se basará en los AEs causados por el tratamiento, datos clínicos de laboratorio, los hallazgos del examen físico, incluyendo los signos vitales, ECGs, y datos PK disponibles después que los 3 sujetos dentro de la cohorte hayan completado los 28 días de terapia usando el diseño de 3+3 indicado para la Parte 1. En el caso de que la combinación de la dosis inicial en la Cohorte 8 no sea segura y bien tolerada, el comité de seguridad puede recomendar evaluar una dosis más baja de STM 434 en combinación con la quimioterapia en una cohorte adicional (ver Secciones 3.1.1 y 5.2.1).
3.2 Toxicidades que limitan las dosis	Un sujeto que experimente una DLT que desea retomar la terapia con una dosis reducida de STM 434 podrá hacerlo a discreción del investigador cuando la toxicidad se ha resuelto a CTCAE Grado ≤ 1 o los valores de la línea de base, y si el sujeto no ha experimentado un avance de la enfermedad.
4.1 Criterios de inclusión	3. a. Sujetos con enfermedad metastásica recurrente o avanzada localmente considerados refractarios o que no toleran todos los tratamientos estándar disponibles para su tumor, o aquellos con tumores para los cuales no se encuentra disponible un tratamiento estándar O b. Sujetos con tumores serosos ováricos/ de las trompas de Falopio/ peritoneales primarios, tumores de las células de la granulosa o tumores de las células claras considerados refractarios/ resistentes al platino, definidos como teniendo al menos un régimen quimioterapéutico a base de platino previo con un intervalo subsiguiente libre de platino de < 12 meses, que tuvieron un avance durante la terapia a base de platino, o que tienen una enfermedad persistente después de una terapia a base de platino, son elegibles. Sujetos que no toleran el platino, definidos como incapaces de recibir más platino debido a la toxicidad, son elegibles. 9. Para la Cohorte 6, los sujetos tienen que tener carcinoma de las células claras ovárico/ endometrial o tumores ováricos de las células de la granulosa refractarios/ resistentes/ que no toleran el platino (como se define en el criterio de inclusión #3b) 10. Para la Cohorte 7, los sujetos tienen que tener cáncer seroso ovárico /de las trompas de Falopio/ peritoneal primario refractario/ resistente/ que no toleran el platino (como se define en el criterio de inclusión #3b) 11. Para las Cohortes 8 y 9, los sujetos tienen que tener cáncer ovárico / de las

	trompas de Falopio / peritoneal primario avanzado refractario/ resistente/ que no tolera el platino (como se define en el criterio de inclusión #3b)												
4.2 Criterios de exclusión	12.Sujetos con una creatinina > 1,5 × ULN y una depuración de creatinina estimada de < 60 mL/min (usando la ecuación de Cockcroft–Gault) 15.Terapia con anticuerpos/biológica dentro de 5 vidas medias o 4 semanas (según la que sea más prolongada) del Ciclo 1 Día 1 (Nota: una abstinencia de 6 semanas será aceptable para sujetos que recibían previamente bevacizumab) 20.Presencia de un dispositivo de shunt venoso portal o una historia de resección hepática amplia												
4.4 Reemplazo de los sujetos	Para la Parte 1 del estudio, si un sujeto se retira de una cohorte por cualquier razón distinta de una DLT antes de completar los 28 días de tratamiento con STM 434 (antes de completar 21 días si se evalúa el Esquema C [Q3W]), se agregará un sujeto de reemplazo a la cohorte, según se requiera, hasta que 3 sujetos por cohorte completen los 28 días de tratamiento con STM 434 (21 días si se evalúa el Esquema C [Q3W]).												
5.2.1 STM 434	En la Parte 1, las cohortes de dosis planificada se describen en la Tabla 1. Los datos PK de la Cohorte 1 indicaron que la dosificación más frecuente que Q4W, tal como Q2W o Q3W, puede optimizar la exposición (ver Sección 1.1.2.3). Durante la Parte 1, si los datos PK de la Cohorte 2 (0,5 mg/kg IV Q4W) confirman las observaciones de la vida media hechas en la Cohorte 1 (0,25 mg/kg IV Q4W), y si el STM 434 es seguro y bien tolerado en la Cohorte 2, la dosis de STM 434 de Q4W (Esquema A) se cambiará a Q2W (Esquema B) (Tabla 2). En el caso de cualquier cambio en el esquema, el mismo nivel de dosis se repetirá en la cohorte siguiente. Por ejemplo, si se toma la decisión de aumentar la frecuencia de la dosis siguiendo a la Cohorte 2, 0,5 mg/kg Q4W, la siguiente cohorte a ser evaluada será la Cohorte 3, 0,5 mg/kg Q2W. Luego, las cohortes subsiguientes se incluirán en el nuevo esquema de Q2W a menos que el comité de revisión de seguridad recomiende disminuir la dosis a una dosificación menos frecuente en respuesta a datos de seguridad. Para la disminución de la dosis, la inclusión de las cohortes que evalúan Q3W (Esquema C) y Q4W (Esquema A) al mismo nivel de dosis se puede realizar concurrentemente, a menos que el comité de seguridad recomiende evaluar sólo el Q4W (Esquema A). Un informe del estudio comunicando cualesquiera decisiones de cambio de esquema será proporcionado a todos los sitios y las IRBs especificando la dosis y la frecuencia de STM 434 a ser estudiada en cada cohorte del protocolo. Tabla 2. Parte 1 Cohortes de dosis planificada <table><tr><th></th><th>Esquema A</th><th>Esquema B</th><th>Esquema C</th></tr><tr><td>Cohorte 1</td><td>0,25 mg/kg de STM 434 IV Q4W</td><td>0,25 mg/kg de STM 434 IV Q2W</td><td>0,25 mg/kg de STM 434 IV Q3W</td></tr><tr><td>Cohorte 2</td><td>0,5 mg/kg de STM 434 IV Q4W</td><td>0,5 mg/kg de STM 434 IV Q2W</td><td>0,5 mg/kg de STM 434 IV Q3W</td></tr></table>		Esquema A	Esquema B	Esquema C	Cohorte 1	0,25 mg/kg de STM 434 IV Q4W	0,25 mg/kg de STM 434 IV Q2W	0,25 mg/kg de STM 434 IV Q3W	Cohorte 2	0,5 mg/kg de STM 434 IV Q4W	0,5 mg/kg de STM 434 IV Q2W	0,5 mg/kg de STM 434 IV Q3W
	Esquema A	Esquema B	Esquema C										
Cohorte 1	0,25 mg/kg de STM 434 IV Q4W	0,25 mg/kg de STM 434 IV Q2W	0,25 mg/kg de STM 434 IV Q3W										
Cohorte 2	0,5 mg/kg de STM 434 IV Q4W	0,5 mg/kg de STM 434 IV Q2W	0,5 mg/kg de STM 434 IV Q3W										

	Cohorte 3	1 mg/kg de STM 434 IV Q4W	1 mg/kg de STM 434 IV Q2W	1 mg/kg de STM 434 IV Q3W
	Cohorte 4	2 mg/kg de STM 434 IV Q4W	2 mg/kg de STM 434 IV Q2W	2 mg/kg de STM 434 IV Q3W
	Cohorte 5	4 mg/kg de STM 434 IV Q4W	4 mg/kg de STM 434 IV Q2W	4 mg/kg de STM 434 IV Q3W
En la Parte 2, las cohortes de dosis planificada son como sigue: Cohorte 6: STM 434 a la RP2D IV a 6 sujetos con adenocarcinoma de las células claras y a 6 sujetos tumores de las células de la granulosa. Cohorte 7: STM 434 a la RP2D IV a 12 sujetos con tumores ováricos serosos				
5.2.1.1 Aumento de dosis intrasuje-to	Si un sujeto no tiene evidencia de enfermedad progresiva radiográfica y no tuvo una DLT, se permitirá el aumento de la dosis intrasujeto al nivel evaluado en la cohorte de la dosis mayor que el comité de seguridad ha declarado previamente seguro y bien tolerado, y a la discreción del investigador. Cualesquiera planes para el aumento de la dosis intrasujeto requieren que el sujeto haya completado el período de evaluación de 28 días DLT (o el período de 21 días si se encuentran en el esquema de dosificación Q3W) y ha completado el cambio de estadio radiográfico del tumor poslínea de base. El aumento de la dosis intrasujeto tiene que ser discutido con el monitor médico.			
5.2.2 Doxorru- bicina liposomal	Los días de tratamiento cuando se administran ambos, doxorubicina liposomal y STM 434 en la Parte 3, la doxorubicina liposomal se administrará primero. La información que especifica la dosis de STM 434 y el esquema para cada cohorte de la Parte 3 será proporcionada a todos los sitios y las IRBs en un informe del estudio. La doxorubicina liposomal debería ser administrada de acuerdo con la información de prescripción del proveedor y de acuerdo con los lineamientos institucionales.			

5.3.1.5 Reducciones de dosis de STM 434 permitidas para toxicidades relacionadas	Tabla 5. Reducción de la dosis de STM 434	
	Nivel de dosis	Instrucciones de reducción de la dosis
	0,25 mg/kg de STM 434 IV-	1ra. aparición: Discontinuar la terapia
	0,5 mg/kg de STM 434 IV	Interrumpir el STM 434 hasta el Grado ≤ 1 , luego: 1ra. aparición: Retomar a un nivel de dosis por debajo de la dosis inicial (por ejemplo, 0,25 mg/kg de STM 434 IV) ^a 2da. aparición: Discontinuar la terapia
	1 mg/kg de STM 434 IV	Interrumpir el STM 434 hasta el Grado ≤ 1 , luego: 1ra. aparición: Retomar a un nivel de dosis por debajo de la dosis inicial (por ejemplo, 0,5 mg/kg de STM 434 IV) ^a 2da. aparición: Retomar a dos niveles de dosis por debajo de la dosis inicial (por ejemplo, 0,25 mg/kg de STM 434 IV) ^a 3ra. aparición: Discontinuar la terapia
	2 mg/kg de STM 434 IV	Interrumpir el STM 434 hasta el Grado ≤ 1 , luego: 1ra. aparición: Retomar a un nivel de dosis por debajo de la dosis inicial (por ejemplo, 1 mg/kg de STM 434 IV) ^a 2da. aparición: Retomar a dos niveles de dosis por debajo de la dosis inicial (por ejemplo, 0,5 mg/kg de STM 434 IV) ^a 3ra. aparición: Discontinuar la terapia
	4 mg/kg de STM 434 IV	Interrumpir el STM 434 hasta el Grado ≤ 1 , luego: 1ra. aparición: Retomar a un nivel de dosis por debajo de la dosis inicial (por ejemplo, 2 mg/kg de STM 434 IV) ^a 2da. aparición: Retomar a dos niveles de dosis por debajo de la dosis inicial (por ejemplo, 1 mg/kg de STM 434 IV) ^a 3ra. aparición: Discontinuar la terapia
	^a La dosis a la cual un sujeto retoma el tratamiento debería ser confirmada con el monitor médico. ^b Si no existe un nivel de dosis más bajo, discontinuar la terapia.	
5.4.1 Medicaciones / terapias permitidas	Los sujetos que tienen ascitis que requieren una intervención médica deberían ser sometidos a paracentesis antes del Ciclo 1 Día 1 y Ciclo 3 Día 1 de dosificación con STM 434 para minimizar los efectos posibles sobre el muestreo PK.	
6.	Las descripciones de los procedimientos/evaluaciones se proporcionan en la	

Procedimientos del estudio	Sección 7. Los esquemas de los procedimientos del estudio, basados en la frecuencia de la dosificación de STM 434 se proporcionan en el Apéndice 1 (dosis Q4W), Apéndice 2 (dosis Q2W) y Apéndice 3 (dosis Q3W).
6.1 Procedimientos para sujetos que reciben STM 434 Q4W	- El siguiente esquema es para los sujetos que reciben STM 434 Q4W. 6.1.1 Selección Estudios de laboratorio (laboratorio local): química del suero, panel de hematología, panel de coagulación, lípidos séricos, análisis de orina, determinación de embarazo en sangre (mujeres con capacidad de tener hijos solamente), examen de guayacol en heces para determinar sangre oculta, FSH, hormonas sexuales (estradiol para los sujetos femeninos, testosterona para los sujetos masculinos), glucosa sérica en ayunas e insulina sérica en ayunas para el cálculo de HOMA, HbA1c, biomarcador(es) de tumores séricos según sea apropiado para el tipo de tumor (por ejemplo, CA-125 para sujetos con cáncer ovárico; PSA para sujetos con cáncer de próstata; CEA para sujetos con cáncer de colon; sustancia inhibidora Mülleriana [MIS; por el laboratorio central] para sujetos con tumores de las células de la granulosa) Evaluaciones radiológicas del cáncer, cardíacas y de la composición corporal (dentro de los 30 días antes de comenzar con la primera dosis de la medicación en estudio): MRI de cerebro para excluir metástasis del CNS se prefiere. MRI/CT abierta con contraste es aceptable si el sujeto no puede o no desea ser sometido a MRI. 6.1.2 Día -1 ECG (un dispositivo Holter del laboratorio central es colocado y llevado hasta la visita del Ciclo 1 Día 2 del estudio) 6.1.3 Fase de tratamiento 6.1.3.1 Ciclo 1/Día 1 - Las siguientes evaluaciones deberían realizarse dentro de los 3 días antes de la visita programada (los estudios de laboratorio deberían ser completados antes de la dosis) a menos que se indique de otra manera más abajo: ECG (los sujetos continúan llevando el dispositivo Holter del laboratorio central que fue colocado el Día -1 hasta la visita del Ciclo 1 Día 2 del estudio) Estudios de laboratorio (laboratorio local): química del suero, panel de hematología, panel de coagulación, FSH, hormonas sexuales (estradiol para los sujetos femeninos, testosterona para los sujetos masculinos), biomarcador(es) de tumores séricos según sea apropiado para el tipo de tumor (por ejemplo, CA-125 para sujetos con cáncer ovárico; PSA para sujetos con cáncer de próstata; CEA para sujetos con cáncer de colon; MIS [por el laboratorio central] para sujetos con tumores de las células de la granulosa) Muestreo PK posdosis dentro de $\pm$ 30 minutos del tiempo de muestreo indicado (ver Apéndice 4); visitas PK y tiempos de muestreo deberían basarse en el tiempo de dosificación real 6.1.3.2 Ciclo 1/Días 2, 3, 8

	Muestreo PK dentro de ± 4 horas del tiempo de muestreo indicado (ver Apéndice 4); visitas PK y tiempos de muestreo deberían basarse en el tiempo de dosificación real 6.1.3.3 Ciclo 1/Día 15 Muestreo PK dentro de ± 1 día del tiempo de muestreo indicado (ver Apéndice 4); visitas PK y tiempos de muestreo deberían basarse en el tiempo de dosificación real 6.1.3.4 Ciclos 2, 4, 6../Día 1 Las evaluaciones siguientes deberían realizarse dentro de ± 3 días de la visita programada a menos que se indique de otra manera más abajo: Estudios de laboratorio (laboratorio local): química del suero, panel de hematología, panel de coagulación, FSH, hormonas sexuales (estradiol para los sujetos femeninos, testosterona para los sujetos masculinos), biomarcador(es) de tumores séricos según sea apropiado para el tipo de tumor (por ejemplo, CA-125 para sujetos con cáncer ovárico; PSA para sujetos con cáncer de próstata; CEA para sujetos con cáncer de colon; MIS [por el laboratorio central] para sujetos con tumores de las células de la granulosa) Estudios de laboratorio especiales (por el laboratorio central): activina A sérica, CTCs (Ciclo 2 Día 1 solamente) Muestreo de inmunología clínica para anticuerpo anti-STM 434 Muestreo PK posdosis dentro de ± 30 minutos del tiempo de muestreo indicado (ver Apéndice 4); visitas PK y tiempos de muestreo deberían basarse en el tiempo de dosificación real 6.1.3.5 Ciclos 3, 5, 7../Día 1 (y al discontinuar el tratamiento) Estudios de laboratorio (laboratorio local): química del suero, panel de hematología, panel de coagulación, FSH, hormonas sexuales (estradiol para los sujetos femeninos, testosterona para los sujetos masculinos), glucosa sérica en ayunas e insulina sérica en ayunas para cálculo de HOMA, HbA1c (en el Ciclo 1 Día 1 y al discontinuar el tratamiento solamente), biomarcador(es) de tumores séricos según sea apropiado para el tipo de tumor (por ejemplo, CA-125 para sujetos con cáncer ovárico; PSA para sujetos con cáncer de próstata; CEA para sujetos con cáncer de colon; MIS [por el laboratorio central] para sujetos con tumores de las células de la granulosa) Estudios de laboratorio especiales (por el laboratorio central): activina A Estudios de laboratorio especiales (laboratorio central): activina A Muestreo de inmunología clínica para anticuerpo anti-STM 434 Muestreo PK posdosis dentro de ± 30 minutos del tiempo de muestreo indicado (ver Apéndice 4). Al discontinuar el tratamiento, la ventana de muestreo PK es ± 3 días. Visitas PK y tiempos de muestreo deberían basarse en el tiempo de dosificación real Evaluaciones de radiología de cáncer, cardíacas y de la composición corporal CT/MRI del laboratorio local de pecho/abdomen/pelvis para determinar estadio
--	--

	del tumor dentro de los 14 días antes del Día 1 (hasta C7D1; luego el investigador puede disminuir la frecuencia de las exploraciones para determinación del estadio del tumor a una vez cada cuarto ciclo si el investigador considera la posibilidad de que el avance de la enfermedad es lento, es decir, C11, C15.) Exploración ósea por el laboratorio local para estadificación del tumor (para sujetos con metástasis óseas solamente; después de C7D1, el investigador puede disminuir la frecuencia de las exploraciones para la estadificación del tumor a una vez cada cuarto ciclo si el investigador considera la posibilidad de que el avance de la enfermedad es baja, es decir, C11, C15..) DXA por el laboratorio central para determinar la composición corporal dentro de los 14 días antes del Día 1 (hasta C7D1; luego, otras exploraciones DXA serán realizadas cada cuarto Ciclo, es decir, a C11, C15.) Laboratorio local: MUGA o ECHO para la función cardíaca (sólo para sujetos en la Parte 3 que recibirán doxorubicina liposomal, en el Ciclo 3 solamente) Test de la función muscular: 6MWT (se debería hacer un esfuerzo para que esta prueba sea realizada en el mismo momento del día y con el mismo examinador que lo realizó en la selección; después de C7D1, 6MWT será determinado cada cuarto ciclo, es decir, a C11, C15.) 6.1.3.6 Ciclo 3/Días 2, 3, 8 Muestreo PK dentro de ± 4 horas del tiempo de muestreo indicado (ver Apéndice 4); visitas PK y tiempos de muestreo deberían basarse en el tiempo de dosificación real 6.1.4 Final del estudio La visita del final del estudio (EOS) debería ser programada 28 ± 3 días después de la última administración de STM 434 para los sujetos que completaron el estudio. Los sujetos que discontinuaron antes de completar el estudio deberían ser sometidos a evaluaciones de EOS en el momento de discontinuar el estudio. Las evaluaciones a ser realizadas en la visita de EOS son las siguientes: Estudios de laboratorio especiales (laboratorio central): activina A sérica
6.2 Procedimientos para los sujetos que reciben STM 434 Q2W	El siguiente esquema es para los sujetos que reciben STM 434 Q2W. Con este esquema, los sujetos recibirán STM 434 el Día 1 y el Día 15 de cada ciclo de 28 días. 6.2.1 Selección Excepto como se indicó, las siguientes evaluaciones / procedimientos deberían ser documentados / realizados dentro de los 14 días antes de comenzar con la primera dosis de la medicación del estudio: Consentimiento informado por escrito por el sujeto (tiene que ser obtenido antes de realizar cualquier procedimientos específico del estudio) Verificación de que el sujeto cumple con todos los criterios de inclusión y exclusión Demografía e historia clínica completa, incluyendo estado BRCA1 (sujetos con cáncer ovárico y de mama)

	Examen físico Altura y peso Cálculo de eCRF del índice de masa corporal (BMI, basado en la altura y el peso más recientes) Signos vitales (temperatura aural, transdérmica u oral, presión sanguínea sentado, y frecuencia cardíaca y respiratoria) Estado de performance de ECOG Medicaciones concomitantes SAEs pre-tratamiento: informados desde el momento en que se firmó el documento de consentimiento informado hasta la administración de la medicación del estudio el Día 1 PRO: FACT/GOG–NTX subescala ECG con 12 derivaciones (realizadas y leídas localmente) Estudios de laboratorio (laboratorio local): química del suero, panel de hematología, panel de coagulación, lípidos séricos, análisis de orina, determinación de embarazo en sangre (mujeres con capacidad de tener hijos solamente), testeo con guayacol de las heces para determinar sangre oculta, FSH, hormonas sexuales (estradiol para sujetos femeninos, testosterona para sujetos masculinos), glucosa sérica en ayunas e insulina sérica para cálculo de HOMA, HbA1c, biomarcador(es) de tumores séricos según sea apropiado para el tipo de tumor (por ejemplo, CA–125 para sujetos con cáncer ovárico; PSA para sujetos con cáncer de próstata; CEA para sujetos con cáncer de colon; MIS [por el laboratorio central] para sujetos con tumores de las células de la granulosa) Estudios de laboratorio especiales (por el laboratorio central): activina A sérica, CTCs, secciones de tumores / bloques de tumores para la expresión génica de ACVR2B e INHBA (todos los sujetos), estado de mutación génica (para sujetos con tumores de las células claras / endometriales / de las células de la granulosa) Muestreo de inmunología clínica para anticuerpo anti–STM 434 Evaluaciones radiológicas de cáncer, cardíacas y de la composición corporal (dentro de 30 días antes de comenzar con la primera dosis de la medicación del estudio): Laboratorio local: CT/MRI de pecho/abdomen/pelvis para estadificación del tumor MRI del cerebro para excluir metástasis del CNS se prefiere. MRI/CT abierta con contraste es aceptable si el sujeto no puede o no desea someterse a una MRI. Laboratorio local: exploración ósea para estadificación del tumor (para sujetos con metástasis óseas solamente) Laboratorio central: DXA para determinar la composición corporal Laboratorio local: MUGA o ECHO (sólo para sujetos en la Parte 3 que recibirán doxorubicina liposomal) Test de función muscular: 6MWT
--	---

	El 6MWT debería realizarse dos veces, el mejor de las 2 pruebas será registrado en el eCRF Los sujetos deberían descansar durante al menos 1 hora entre las 2 pruebas Debería realizarse un esfuerzo para realizar los 6MWTs subsiguientes en el mismo momento del día, con el mismo examinador 6.2.2 Día –1 ECG (se coloca un dispositivo Holter del laboratorio central y se lleva hasta la visita del Ciclo 1 Día 2 del estudio) 6.2.3 Fase de tratamiento 6.2.3.1 Ciclo 1/Día 1 Las siguientes evaluaciones deberían realizarse dentro de los 3 días antes de la visita programada (los estudios de laboratorio deberían ser completados antes de la dosis) a menos que se indique de otra manera más abajo: Examen físico Peso corporal Cálculo de eCRF de BMI (basado en el peso y la altura más recientes) Signos vitales (temperatura aural, transdérmica u oral, presión sanguínea sentado y frecuencia cardíaca y respiratoria) Estado de performance de ECOG ECG (los sujetos continúan llevando el dispositivo Holter del laboratorio central que fue colocado en la visita del Día –1 hasta la visita del Ciclo 1 Día 2 del estudio) Estudios de laboratorio (laboratorio local): química del suero, panel de hematología, panel de coagulación, FSH, hormonas sexuales (estradiol para sujetos femeninos, testosterona para sujetos masculinos), biomarcador(es) de tumores séricos según sea apropiado para el tipo de tumor (por ejemplo, CA–125 para sujetos con cáncer ovárico; PSA para sujetos con cáncer de próstata; CEA para sujetos con cáncer de colon; MIS [por el laboratorio central] para sujetos con tumores de las células de la granulosa) Estudios de laboratorio especiales (por el laboratorio central): activina A sérica Muestreo de inmunología clínica (por el laboratorio central) para anticuerpo anti–STM 434 Administración de STM 434 Administración de doxorrubicina liposomal (Parte 3 solamente) Medicaciones concomitantes Eventos adversos Muestreo PK posdosis dentro de $\pm$ 30 minutos del tiempo de muestreo indicado (ver Apéndice 5); visitas y tiempos de muestreo PK deberían basarse en el tiempo de dosificación real
--	---

	6.2.3.2 Ciclo 1/Días 2, 3, 8 Retirar el monitor Holter (Día 2 solamente) Muestreo PK dentro de ± 4 horas del tiempo de muestreo indicado (ver Apéndice 5); visitas y tiempos de muestreo PK deberían basarse en el tiempo de dosificación real 6.2.3.3 Ciclo 1/Día 15 Las siguientes evaluaciones deberían realizarse el Día 15 $\pm$ 1 día: Examen físico Peso corporal Cálculo de eCRF de BMI (basado en el peso y la altura más recientes) Signos vitales (temperatura aural, transdérmica u oral, presión sanguínea sentado y frecuencia cardíaca y respiratoria) Estado de performance ECOG Administración de STM 434 Medicaciones concomitantes Eventos adversos PRO: FACT/GOG–NTX subescala Estudios de laboratorio (laboratorio local): química del suero, panel de hematología, panel de coagulación, FSH, hormonas sexuales (estradiol para sujetos femeninos, testosterona para sujetos masculinos) Estudios de laboratorio especiales (por el laboratorio central): activina A sérica Muestreo PK dentro de 1 día antes del tiempo de muestreo indicado (ver Apéndice 5); visitas y tiempos de muestreo PK deberían basarse en el tiempo de dosificación real 6.2.3.4 Ciclos 2, 4, 6../Día 1 Las siguientes evaluaciones deberían realizarse dentro de ± 3 días de la visita programada a menos que se indique de otra manera más abajo: Examen físico Peso corporal Cálculo de eCRF de BMI (basado en el peso y la altura más recientes) Signos vitales (temperatura aural, transdérmica u oral, presión sanguínea sentado y frecuencia cardíaca y respiratoria) Estado de performance ECOG Administración de STM 434 Administración de doxorrubicina liposomal (Parte 3 solamente) Medicaciones concomitantes Eventos adversos
--	--

	PRO: FACT/GOG–NTX subescala ECG con 12 derivaciones (usando equipo del laboratorio central) Estudios de laboratorio (laboratorio local): química del suero, panel de hematología, panel de coagulación, FSH, hormonas sexuales (estradiol para sujetos femeninos, testosterona para sujetos masculinos), biomarcador(es) de tumores séricos según sea apropiado para el tipo de tumor (por ejemplo, CA–125 para sujetos con cáncer ovárico; PSA para sujetos con cáncer de próstata; CEA para sujetos con cáncer de colon; MIS [por el laboratorio central] para sujetos con tumores de las células de la granulosa) Estudios de laboratorio especiales (por el laboratorio central): activina A sérica, CTCs (Ciclo 2 Día 1 solamente) Muestreo de inmunología clínica para anticuerpo anti–STM 434 Muestreo PK dentro de ± 4 horas del tiempo de muestreo indicado (ver Apéndice 5); visitas y tiempos de muestreo PK deberían realizarse basados en el tiempo de dosificación real Tests de función muscular (Ciclo 2 solamente): 6MWT (debería realizarse un esfuerzo para realizar esta prueba en el mismo momento del día y con el mismo examinador que lo realizó en la selección) 6.2.3.5 Ciclos 2, 4, 6../Día 15 Las siguientes evaluaciones deberían realizarse dentro de ± 3 días de la visita programada a menos que se indique de otra manera más abajo: Examen físico Peso corporal Cálculo de eCRF de BMI (basado en el peso y la altura más recientes) Signos vitales (temperatura aural, transdérmica u oral, presión sanguínea sentado y frecuencia cardíaca y respiratoria) Administración de STM 434 Medicaciones concomitantes Eventos adversos Muestreo PK pre–dosis dentro de 1 día antes del tiempo de muestreo indicado (ver Apéndice 5); visitas y tiempos de muestreo PK deberían basarse en el tiempo de dosificación real 6.2.3.6 Ciclos 3, 5, 7../Día 1 (y al discontinuar el tratamiento) Las siguientes evaluaciones deberían realizarse dentro de ± 3 días de la visita programada: Examen físico Peso corporal Cálculo de eCRF de BMI (basado en el peso y la altura más recientes) Signos vitales (temperatura aural, transdérmica u oral, presión sanguínea sentado y
--	---

	frecuencia cardíaca y respiratoria) Estado de performance ECOG Administración de STM 434 Administración de doxorrubicina liposomal (Parte 3 solamente) Medicaciones concomitantes Eventos adversos PRO: FACT/GOG–NTX subescala ECG (12 derivaciones usando equipo del laboratorio central) Estudios de laboratorio (laboratorio local): química del suero, panel de hematología, panel de coagulación, panel de lípidos, FSH, hormonas sexuales (estradiol para sujetos femeninos, testosterona para sujetos masculinos), glucosa sérica en ayunas, e insulina sérica en ayunas para cálculo de HOMA, HbA1c (en el Ciclo 3 Día 1 y al discontinuar el tratamiento solamente), biomarcador(es) de tumores séricos según sea apropiado para el tipo de tumor (por ejemplo, CA–125 para sujetos con cáncer ovárico; PSA para sujetos con cáncer de próstata; CEA para sujetos con cáncer de colon; MIS [por el laboratorio central] para sujetos con tumores de las células de la granulosa) Estudios de laboratorio especiales (laboratorio central): activina A Muestreo de inmunología clínica para anticuerpo anti–STM 434 Muestreo PK posdosis dentro de ± 30 minutos del tiempo de muestreo indicado (ver Apéndice 5). Al discontinuar el tratamiento, la ventana de muestreo PK es de ± 3 días. Visitas y tiempos de muestreo PK deberían basarse en el tiempo de dosificación real Evaluaciones radiológicas de cáncer, cardíacas y de la composición corporal Laboratorio local: CT/MRI de pecho/abdomen/pelvis para estadificación del tumor dentro de 14 días antes del Día 1 (hasta C7D1; luego, el investigador puede disminuir la frecuencia de las exploraciones para estadificación del tumor a una vez cada cuarto ciclo si el investigador considera que la probabilidad de un avance de la enfermedad es bajo, es decir, C11, C15..) Laboratorio local: exploración ósea para estadificación del tumor (para sujetos con metástasis óseas solamente; después de C7D1, el investigador puede disminuir la frecuencia de las exploraciones para estadificación del tumor a una vez cada cuarto ciclo si el investigador considera que la probabilidad de un avance de la enfermedad es bajo, es decir, disminuir la frecuencia de las exploraciones para estadificación del tumor a una vez cada cuarto ciclo si el investigador considera que la probabilidad de un avance de la enfermedad es bajo, es decir, C11, C15..) Laboratorio central: DXA para determinar la composición corporal dentro de 14 días antes del Día 1 (hasta C7D1; luego, se realizarán otras exploraciones de DXA cada cuarto Ciclo, es decir, en C11, C15..) Laboratorio local: MUGA o ECHO para la función cardíaca (solamente para sujetos en la Parte 3 que recibirán doxorrubicina liposomal, en el Ciclo 3 solamente)
--	--

	Test de función muscular: 6MWT (debería realizarse un esfuerzo para realizar esta prueba en el mismo momento del día y con el mismo examinador que lo realizó en la selección); después de C7D1, se realizará el 6MWT cada cuarto ciclo, es decir, en C11, C15.) 6.2.3.7 Ciclo 3/Días 2, 3, 8 Muestreo PK dentro de ± 4 horas del tiempo de muestreo indicado (ver Apéndice 5); Visitas y tiempos de muestreo PK deberían basarse en el tiempo de dosificación real 6.2.3.8 Ciclos 3, 5, 7../Día 15 Las siguientes evaluaciones deberían realizarse dentro de ± 3 días de la visita programada a menos que se indique de otra manera más abajo: Examen físico Peso corporal Cálculo de eCRF de BMI (basado en el peso y la altura más recientes) Signos vitales (temperatura aural, transdérmica u oral, presión sanguínea sentado, y frecuencia cardíaca y respiratoria) Administración de STM 434 Medicaciones concomitantes Eventos adversos Muestreo PK pre–dosis dentro de 1 día antes del tiempo de muestreo indicado (ver Apéndice 5); visitas y tiempos de muestreo PK deberían basarse en el tiempo de dosificación real 6.2.4 Final del estudio La visita del EOS debería ser programada 28 ± 3 días después de la última administración de STM 434 para los sujetos que completaron el estudio. Los sujetos que discontinuaron antes de completar el estudio deberían ser sometidos a las evaluaciones del EOS en el momento de discontinuar el estudio. Las evaluaciones que se deben realizar en la visita del EOS son como sigue: Examen físico Peso corporal Cálculo eCRF de BMI (basado en el peso y la altura más recientes) Signos vitales (temperatura aural, transdérmica u oral, presión sanguínea sentado, y frecuencia cardíaca y respiratoria) Estado de performance ECOG Eventos adversos PRO: FACT/GOG–NTX subescala ECG con 12 derivaciones (usando equipo del laboratorio central) Estudios de laboratorio (laboratorio local): química del suero, panel de hematología, panel de coagulación, panel de lípidos, FSH, hormonas sexuales
--	---

	(estradiol para sujetos femeninos, testosterona para sujetos masculinos), HbA1c, biomarcador(es) de tumores séricos según sea apropiado para el tipo de tumor (por ejemplo, CA-125 para sujetos con cáncer ovárico, PSA para sujetos con cáncer de próstata, CEA para sujetos con cáncer de colon) Estudios de laboratorio especiales (laboratorio central): activina A sérica Muestreo de inmunología clínica para anticuerpo anti-STM 434
6.3 Procedimientos para los sujetos que reciben STM 434 Q3W	El siguiente esquema es para los sujetos que reciben STM 434 Q3W. En este esquema, los sujetos recibirán STM 434 el Día 1 de cada Ciclo de 21 días. 6.3.1 Selección Excepto como se indicó, las siguientes evaluaciones / procedimientos deberían ser documentados / realizados dentro de 14 días antes de comenzar con la primera dosis de la medicación del estudio: Consentimiento informado escrito por el sujeto (tiene que ser obtenido antes de realizar cualquier procedimiento específico del estudio) Verificación de que el sujeto cumple con todos los criterios de inclusión y exclusión Demografía e historia clínica completa, incluyendo estado BRCA1 (sujetos con cáncer ovárico y de mama) Examen físico Altura y peso Cálculo de eCRF del índice de masa corporal (BMI, basado en el peso y la altura más recientes) Signos vitales (temperatura aural, transdérmica u oral, presión sanguínea sentado, y frecuencia cardíaca y respiratoria) Estado de performance ECOG Medicaciones concomitantes SAEs pre-tratamiento: informados desde el momento en que se firmó el documento de consentimiento informado hasta la administración de la medicación del estudio el Día 1 PRO: FACT/GOG-NTX subescala ECG con 12 derivaciones (realizado y leído localmente) Estudios de laboratorio (laboratorio local): química del suero, panel de hematología, panel de coagulación, lípidos séricos, análisis de orina, determinación de embarazo en sangre (mujeres con capacidad de tener hijos solamente), testeo con guayacol de las heces para determinar sangre oculta, FSH, hormonas sexuales (estradiol para sujetos femeninos, testosterona para sujetos masculinos), glucosa sérica en ayunas y insulina sérica para cálculo de HOMA, HbA1c, biomarcador(es) de tumores séricos según sea apropiado para el tipo de tumor (por ejemplo, CA-125 para sujetos con cáncer ovárico; PSA para sujetos con cáncer de próstata; CEA para sujetos con cáncer de colon; MIS [por el laboratorio central] para sujetos con tumores de las células de la granulosa)

	Estudios de laboratorio especiales (por el laboratorio central): activina A sérica, CTCs, secciones del tumor / bloques del tumor para la expresión génica de ACVR2B e INHBA (todos los sujetos), estado de mutación génica (para sujetos con tumores de las células claras / endometriales / de las células de la granulosa) Muestreo de inmunología clínica para anticuerpo anti–STM 434 Evaluaciones radiológicas de cáncer, cardíacas y de la composición corporal (dentro de 30 días antes de comenzar con la primera dosis de la medicación del estudio): Laboratorio local: CT/MRI de tórax/abdomen/pelvis para estadificación del tumor MRI del cerebro para excluir metástasis del CNS se prefiere. MRI/CT abierta con contraste es aceptable si el sujeto no puede o no desea someterse a una MRI. Laboratorio local: exploración ósea para estadificación del tumor (para sujetos con metástasis óseas solamente) Laboratorio central: DXA para determinar composición corporal Test de función muscular: 6MWT El 6MWT debería realizarse dos veces, el mejor de las 2 pruebas será registrado en el eCRF Los sujetos deberían descansar durante al menos 1 hora entre las 2 pruebas Debería realizarse un esfuerzo para realizar los 6MWTs subsiguientes en el mismo momento del día y con el mismo examinador 6.3.2 Día –1 ECG (se coloca un dispositivo Holter del laboratorio central y se lleva hasta la visita del Ciclo 1 Día 2 del estudio) 6.3.3 Fase de tratamiento 6.3.3.1 Ciclo 1/Día 1 Las siguientes evaluaciones deberían realizarse dentro de 3 días antes de la visita programada (los estudios de laboratorio deberían completarse pre–dosis) a menos que se indique de otra manera más abajo: Examen físico Peso corporal Cálculo de eCRF del BMI (basado en el peso y la altura más recientes) Signos vitales (temperatura aural, transdérmica u oral, presión sanguínea sentado y frecuencia cardíaca y respiratoria) Estado de performance ECOG ECG (los sujetos continúan llevando el dispositivo Holter del laboratorio central que fue colocado el Día –1 hasta la visita del Ciclo 1 Día 2 del estudio) Estudios de laboratorio (laboratorio local): química del suero, panel de hematología, panel de coagulación, FSH, hormonas sexuales (estradiol para sujetos femeninos, testosterona para sujetos masculinos), biomarcador(es) de
--	--

	tumores séricos según sea apropiado para el tipo de tumor (por ejemplo, CA-125 para sujetos con cáncer ovárico; PSA para sujetos con cáncer de próstata; CEA para sujetos con cáncer de colon; MIS [por el laboratorio central] para sujetos con tumores de las células de la granulosa) Estudios de laboratorio especiales (por el laboratorio central): activina A sérica Muestreo de inmunología clínica (por el laboratorio central) para el anticuerpo anti-STM 434 Administración de STM 434 Medicaciones concomitantes Eventos adversos Muestreo PK posdosis dentro de ± 30 minutos del tiempo de muestreo indicado (ver Apéndice 6); visitas y tiempos de muestreo PK deberían basarse en el tiempo de dosificación real 6.3.3.2 Ciclo 1/Días 2, 3, 8 Retirar el monitor Holter (Día 2 solamente) Muestreo PK dentro de ± 4 horas del tiempo de muestreo indicado (ver Apéndice 6); visitas y tiempos de muestreo PK deberían basarse en el tiempo de dosificación real 6.3.3.3 Ciclo 1/Día 15 Muestreo PK dentro de ± 1 día del tiempo de muestreo indicado (ver Apéndice 6); visitas y tiempos de muestreo PK deberían basarse en el tiempo de dosificación real 6.3.3.4 Ciclos 2, 4, 6../Día 1 Las siguientes evaluaciones deberían realizarse dentro de ± 3 días de la visita programada a menos que se indique de otra manera más abajo: Examen físico Peso corporal Cálculo de eCRF del BMI (basado en el peso y la altura más recientes) Signos vitales (temperatura aural, transdérmica u oral, presión sanguínea sentado y frecuencia cardíaca y respiratoria) Estado de performance ECOG Administración de STM 434 Medicaciones concomitantes Eventos adversos PRO: FACT/GOG-NTX subescala ECG con 12 derivaciones (usando equipo del laboratorio central) Estudios de laboratorio (laboratorio local): química del suero, panel de hematología, panel de coagulación, FSH, hormonas sexuales (estradiol para sujetos femeninos, testosterona para sujetos masculinos), biomarcador(es) de
--	--

	tumores séricos según sea apropiado para el tipo de tumor (por ejemplo, CA-125 para sujetos con cáncer ovárico; PSA para sujetos con cáncer de próstata; CEA para sujetos con cáncer de colon; MIS [por el laboratorio central] para sujetos con tumores de las células de la granulosa) Estudios de laboratorio especiales (por el laboratorio central): activina A sérica, CTCs (Ciclo 2 Día 1 solamente) Muestreo de inmunología clínica para el anticuerpo anti-STM 434 Muestreo PK dentro de ± 4 horas del tiempo de muestreo indicado (ver Apéndice 6); visitas y tiempos de muestreo PK deberían basarse en el tiempo de dosificación real Test de función muscular (Ciclo 2 solamente): 6MWT (debería realizarse un esfuerzo para realizar esta prueba en el mismo momento del día y con el mismo examinador que lo realizó en la selección) 6.3.3.5 Ciclos 3, 5, 7../Día 1 (y al discontinuar el tratamiento) Las siguientes evaluaciones deberían realizarse dentro de ± 3 días de la visita programada: Examen físico Peso corporal Cálculo de eCRF del BMI (basado en el peso y la altura más recientes) Signos vitales (temperatura aural, transdérmica u oral, presión sanguínea sentado, y frecuencia cardíaca y respiratoria) Estado de performance ECOG Administración de STM 434 Medicaciones concomitantes Eventos adversos PRO: FACT/GOG-NTX subescala ECG (12 derivaciones usando equipo del laboratorio central) Estudios de laboratorio (laboratorio local): química del suero, panel de hematología, panel de coagulación, panel de lípidos, FSH, hormonas sexuales (estradiol para sujetos femeninos, testosterona para sujetos masculinos), glucosa sérica en ayunas, y insulina sérica en ayunas para cálculo de HOMA, HbA1c (en el Ciclo 3 Día 1 y al discontinuar el tratamiento solamente), biomarcador(es) de tumores séricos según sea apropiado para el tipo de tumor (por ejemplo, CA-125 para sujetos con cáncer ovárico; PSA para sujetos con cáncer de próstata; CEA para sujetos con cáncer de colon; MIS [por el laboratorio central] para sujetos con tumores de las células de la granulosa) Estudios de laboratorio especiales (laboratorio central): activina A Muestreo de inmunología clínica para el anticuerpo anti-STM 434 Muestreo PK posdosis dentro de ± 30 minutos del tiempo de muestreo indicado (ver Apéndice 6). Al discontinuar el tratamiento, la ventana del muestreo PK es de
--	--

	± 3 días. Visitas y tiempos de muestreo PK deberían basarse en el tiempo de dosificación real Evaluaciones radiológicas de cáncer, cardíacas y de la composición corporal Laboratorio local: CT/MRI de tórax/abdomen/pelvis para la estadificación del tumor dentro de 14 días antes del Día 1 (hasta C7D1; luego el investigador puede disminuir la frecuencia de las exploraciones para la estadificación del tumor a una vez cada cuarto ciclo si el investigador considera que la probabilidad de que avance la enfermedad es baja, es decir, C11, C15..) Laboratorio local: exploración ósea para la estadificación del tumor (para sujetos con metástasis óseas solamente; después de C7D1, el investigador puede disminuir la frecuencia de las exploraciones para la estadificación del tumor a una vez cada cuarto ciclo si el investigador considera que la probabilidad de que avance la enfermedad es baja, es decir, C11, C15..) Laboratorio central: DXA para determinar la composición corporal dentro de 14 días antes del Día 1 (hasta C7D1; luego se realizarán otras exploraciones de DXA cada cuarto Ciclo, es decir, en C11, C15..) Test de función muscular: 6MWT, debería realizarse un esfuerzo para realizar esta prueba en el mismo momento del día y con el mismo examinador que lo realizó en la selección; después de C7D1, se realizará el 6MWT cada cuarto ciclo, es decir, en C11, C15..) 6.3.3.6 Ciclo 3/Días 2, 3, 8 Muestreo PK dentro de ± 4 horas del tiempo de muestreo indicado (ver Apéndice 6); visitas y tiempos de muestreo PK deberían basarse en el tiempo de dosificación real 6.3.4 Final del estudio La visita del EOS debería ser programada 28 ± 3 días después de la última administración de STM 434 para los sujetos que completaron el estudio. Los sujetos que discontinúan antes de completar el estudio deberían ser sometidos a las evaluaciones del EOS en el momento de discontinuar el estudio. Las evaluaciones que deben ser realizadas en la visita del EOS son las siguientes: Examen físico Peso corporal Cálculo de eCRF del BMI (basado en el peso y la altura más recientes) Signos vitales (temperatura aural, transdérmica u oral, presión sanguínea sentado y frecuencia cardíaca y respiratoria) Estado de performance ECOG Eventos adversos PRO: FACT/GOG–NTX subescala ECG con 12 derivaciones (usando equipo del laboratorio central) Estudios de laboratorio (laboratorio local): química del suero, panel de hematología, panel de coagulación, panel de lípidos, FSH, hormonas sexuales
--	--

	(estradiol para sujetos femeninos, testosterona para sujetos masculinos), HbA1c, biomarcador(es) de tumores séricos según sea apropiado para el tipo de tumor (por ejemplo, CA-125 para sujetos con cáncer ovárico, PSA para sujetos con cáncer de próstata, CEA para sujetos con cáncer de colon) Estudios de laboratorio especiales (laboratorio central): activina A sérica Muestreo de inmunología clínica para el anticuerpo anti-STM 434
7. Evaluaciones de eficacia y seguridad	Cada variable de eficacia y seguridad se describe más abajo. Los esquemas para todas las evaluaciones se indican en la Sección 6 y son presentados en formato tabular en el apéndice 1 (para la dosificación de Q4W [Esquema A]), Apéndice 2 (para la dosificación de Q2W [Esquema B]), y Apéndice 3 (para la dosificación de Q3W [Esquema C]).
7.1 Farmacocinética	Las concentraciones plasmáticas de STM 434 serán determinadas por un laboratorio central (los tiempos de muestreo sanguíneos se describen para las dosificaciones de Q4W, Q2W, y Q3W de STM 434 en el Apéndice 4, el Apéndice 5 y el Apéndice 6, respectivamente).
7.2.4.1 Biomarcadores	Todas las muestras de laboratorio para biomarcadores deberían ser tomadas antes de la dosificación.
7.2.4.1.1 Biomarcadores tumorales	Los marcadores tumorales no deberían usarse como la única evidencia del avance de la enfermedad en ausencia de avance radiográfico según RECIST 1.1.
7.2.4.1.2 Biomarcadores tumorales séricos (Activina A, FSH, Estradiol, Testosterona)	Como las mediciones de los biomarcadores de inhibina en los pacientes con tumores de las células de la granulosa pueden confundirse en presencia de STM 434, se pueden realizar ensayos de MIS en el laboratorio central.
7.2.4.1.3 Biomarcadores tumorales tisulares	Las secciones de tumores incorporadas en parafina fijadas con formalina serán examinadas con respecto a la señalización autocrina/paracrina midiendo el mRNA para el receptor ACVR2B y el ligando INHBA (todos los sujetos) en la selección usando un ensayo RNAScope® validado.
7.2.4.2 Lípidos séricos	Todas las muestras de lípidos deberían ser tomadas antes de la dosificación.
7.2.4.3	Todas las muestras de insulina y glucosa en ayunas y HbA1c deberían ser tomadas

Glucosa sérica en ayunas e insulina por evaluación del modelo homeostático, y HbA1c	antes de la dosificación.
7.3 Seguridad	Todas las muestras de seguridad de laboratorio deberían ser tomadas antes de la dosificación.
9.6 Determinación del tamaño de la muestra	El estudio está planificado para incluir hasta un total de 75 sujetos (que consisten en hasta 39 sujetos en la Parte 1, 24 sujetos en la Parte 2, y hasta 12 sujetos en la Parte 3).
Apéndices	El Apéndice 1 fue modificado para alinearse con los procedimientos del estudio específicos para la dosificación Q4W de STM 434 El Apéndice 2 resume los procedimientos del estudio específicos para la dosificación Q2W de STM 434 El Apéndice 3 resume los procedimientos del estudio específicos para la dosificación Q3W de STM 434 El Apéndice 4 fue modificado para especificar el esquema de muestreo PK durante la dosificación Q4W de STM 434 El Apéndice 5 resume el esquema de muestreo PK durante la dosificación Q2W de STM 434 El Apéndice 6 resume el esquema del muestreo PK durante la dosificación Q3W de STM 434

Apéndice 1: Procedimientos del estudio para STM 434 administrado Q4W											
Evaluación	Selección		Fase de tratamiento								Final del estudio ²
			Ciclo 1			Ciclos 2, 4, 6...	Ciclos 3, 5, 7...				
	Días -14 to 1	Día -1	Día 1 (-3 días)	Días 2, 3, 8	Día 15 (± 1 día)	Día 1 (± 3 días)	Día 1 (± 3 días)	Días 2, 3, 8	Día 15 (± 1 día)	Discontin. del tratamiento ¹	
Formulario de consentimiento firmado	X										
Historia clínica, demografía, terapias	X										

Apéndice 1: Procedimientos del estudio para STM 434 administrado Q4W											
Evaluación	Selección		Fase de tratamiento								Final del estudio ²
			Ciclo 1			Ciclos 2, 4, 6...	Ciclos 3, 5, 7...				
	Días -14 to 1	Día -1	Día 1 (-3 días)	Días 2, 3, 8	Día 15 (± 1 día)	Día 1 (± 3 días)	Día 1 (± 3 días)	Días 2, 3, 8	Día 15 (± 1 día)	Discontin. del tratamiento ¹	
anteriores para el cáncer											
Examen físico, altura y peso ³	X		X		X	X	X			X	X
Examen de las heces con guayacol	X ⁴										
Signos vitales ⁵	X		X		X	X	X			X	X
ECOG	X		X		X	X	X			X	X
ECG ⁶	X	X		X ⁶		X	X			X	X
FACT/GOG-NTX ⁷	X				X	X	X			X	X
MUGA o ECHO	X ⁸						X ⁸			X ⁸	
Administración de STM 434			X			X	X			X	
Administración de la dosis de doxorubicina liposomal ⁹			X			X	X			X	
Medicaciones concomitantes	X		X		X	X	X			X	X
Eventos adversos	X ¹⁰		X		X	X	X			X	X ¹¹
Hematología	X		X		X	X	X			X	X
Panel de coagulación (PT, PTT, INR, TT ¹² , D-dímero ¹²)	X		X		X	X	X			X	X
Química del suero	X		X		X	X	X			X	X
Glucosa en ayunas e insulina en	X						X			X	

Apéndice 1: Procedimientos del estudio para STM 434 administrado Q4W											
Evaluación	Selección		Fase de tratamiento								Final del estudio ²
			Ciclo 1			Ciclos 2, 4, 6...	Ciclos 3, 5, 7...				
	Días -14 to 1	Día -1	Día 1 (-3 días)	Días 2, 3, 8	Día 15 (± 1 día)	Día 1 (± 3 días)	Día 1 (± 3 días)	Días 2, 3, 8	Día 15 (± 1 día)	Discontin. del tratamiento ¹	
ayunas											
HbA1c ¹³	X						X ¹³			X ¹³	X
Lípidos séricos	X						X			X	X
Biomarcadores tumorales séricos ¹⁴	X		X			X	X			X	X
Biomarcadores tumorales tisulares ¹⁵	X										
Análisis de orina (tira de prueba)	X										
Test de embarazo en sangre ¹⁶	X										
Activina A (libre y total)	X		X		X	X	X			X	X
CTCs	X ¹⁷					X ¹⁷					
FSH, estradiol (sujetos femeninos), testosterona (sujetos masculinos)	X		X		X	X	X			X	X
Laboratorio central DXA	X ¹⁸						X ¹⁹			X ¹⁹	
Test de caminata de 6 minutos	X					X ²⁰	X			X	
CT/MRI en la selección	X										
CT/MRI de tórax/abdomen /pelvis	X ¹⁸						X ¹⁹			X ¹⁹	
Exploración	X ¹⁸						X ¹⁹			X ¹⁹	

Apéndice 1: Procedimientos del estudio para STM 434 administrado Q4W											
Evaluación	Selección		Fase de tratamiento								Final del estudio ²
			Ciclo 1			Ciclos 2, 4, 6...	Ciclos 3, 5, 7...				
	Días -14 to 1	Día -1	Día 1 (-3 días)	Días 2, 3, 8	Día 15 (± 1 día)	Día 1 (± 3 días)	Día 1 (± 3 días)	Días 2, 3, 8	Día 15 (± 1 día)	Discontin. del tratamiento ¹	
ósea ²¹											
Evaluación del avance de la enfermedad ²²							X			X	
Anticuerpo anti-STM 434	X		X			X	X			X	X
PK pre-dosis			X ²³			X ²³	X ²³			X ²³	
PK posdosis			X ²³	X ²³	X ²³	X ²³		X ²³	X ²³		

Notas al pie de página con referencia a los procedimientos del estudio

¹ La visita de discontinuación del tratamiento puede ocurrir en cualquier visita programada o no programada cuando sea apropiado. En esta visita, se requiere la documentación para confirmar el avance de la enfermedad o una toxicidad inaceptable.

² La visita de EOS debería ser programada 28 ± 3 días después de la última administración de STM 434.

³ El peso del sujeto es registrado en cada visita; la altura es registrada solamente en la visita de la selección.

⁴ El examen de guayacol en las heces se requiere en la selección y puede ser repetido a discreción del investigador poslínea de base.

⁵ Signos vitales: temperatura aural, transdérmica u oral, presión sanguínea sentado, frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria

⁶ Después de la visita de la selección, los ECGs tienen que ser realizados usando equipo del laboratorio central. A partir del Día -1 los sujetos llevarán un monitor Holter continuamente hasta la visita del Ciclo 1/Día 2, momento en el cual se retirará el monitor Holter. El Día 1 de cada uno de los ciclos subsiguientes y en la visita del EOS, se realizarán ECGs con 12 derivaciones con el equipo del laboratorio central.

⁷ El FACT/GOG-NTX puede ser realizado en visitas no programadas si se necesita para evaluar un AE de neuropatía.

⁸ Solamente los sujetos en la Parte 3 requieren MUGA o ECHO para documentar la fracción de eyección cardíaca para la administración de doxorubicina liposomal. La elección de MUGA o ECHO es a discreción del investigador, pero una vez que se selecciona una modalidad, debería usarse el mismo método para el sujeto durante todo el período del estudio. MUGA/ECHO debe realizarse solamente en la selección y en el Ciclo 3 Día 1. En caso de que un sujeto tratado con doxorubicina en la Parte 3 discontinúa antes del Ciclo 3 Día 1, debería realizarse un MUGA/ECHO en la visita de discontinuación del tratamiento.

- ⁹ La administración de doxorubicina liposomal está limitada a sujetos en la Parte 3 del estudio.
- ¹⁰ Los SAEs pretratamiento deberían ser informados a partir del momento en que se firma el documento de consentimiento informado hasta la administración de la medicación del estudio en el Ciclo 1 Día 1.
- ¹¹ Se requiere un seguimiento del AE durante 30 días después de la última administración de STM 434 para determinar si hay algún AE nuevo o SAEs independientemente de la atribución de causalidad. El seguimiento puede ser realizado por teléfono y debe ser documentado en las notas de origen.
- ¹² Selección y Ciclo 2 Día 1 solamente.
- ¹³ El HbA1c será recogido y analizado en la selección, en el Ciclo 3 Día 1, en la discontinuación del tratamiento y en el EOS solamente.
- ¹⁴ Los biomarcadores tumorales séricos pueden incluir CA-125, PSA, CA 19-9, CEA, u otros biomarcadores según sea apropiado en base al tipo de tumor del sujeto. Para los pacientes con tumores de las células de la granulosa, realizar MIS en el laboratorio central en el Día 1 de cada ciclo.
- ¹⁵ Los biomarcadores tumorales tisulares incluyen secciones del tumor / bloques del tumor para la expresión génica de ACVR2B e INHBA (todos los sujetos) así como también el estado de mutación génica (para los sujetos con tumores de las células claras / endometriales / de las células de la granulosa).
- ¹⁶ Mujeres con capacidad para tener hijos solamente.
- ¹⁷ Los CTCs serán realizados en la selección y en el Ciclo 2 Día 1 solamente.
- ¹⁸ Las exploraciones (DXA, CT, MRI, ósea) realizadas hasta 30 días antes del Ciclo 1 Día 1 se pueden usar para las evaluaciones de la línea de base.
- ¹⁹ Las exploraciones en estudio de DXA, CT/MRI y óseas pueden ser realizadas dentro de 14 días antes de la visita del Día 1. Después que se realizaron las exploraciones en la visita del Ciclo 7 Día 1, las exploraciones subsiguientes pueden ser realizadas cada cuarto ciclo si el investigador considera que la probabilidad de avance de la enfermedad es baja.
- ²⁰ La prueba de la caminata de 6 minutos será completada solamente en la visita del Ciclo 2 Día 1.
- ²¹ Las evaluaciones de las exploraciones óseas deberían ser realizadas a discreción del investigador, por ejemplo, si el sujeto tiene tumores metastásicos en los huesos.
- ²² El investigador debería evaluar las exploraciones radiográficas de acuerdo con RECIST 1.1 (Apéndice 7)
- ²³ El esquema detallado para las evaluaciones PK se presenta en el Apéndice 4 de este protocolo. Notar que las evaluaciones PK del Día 2, 3, y 8 se realizan en el Ciclo 1 y el Ciclo 3 solamente.

Apéndice 2. Procedimientos del estudio para STM 434 administrado Q2W (dosificación de STM 434 en los Días 1 y 15 de cada ciclo de 28 días)

Evaluación	Selección		Fase de tratamiento									Final del estudio ²
			Ciclo 1			Ciclos 2, 4, 6...		Ciclos 3, 5, 7...				
	Días -14 to 1	Día -1	Día 1 (-3 días)	Días 2, 3, 8	Día 15 (± 1 día)	Día 1 (± 3 días)	Día 15 (± 3 días)	Día 1 (± 3 días)	Día 2, 3, 8	Día 15 (± 3 días)	Discont. del tratamiento ¹	
Formulario de consentimiento o firmado	X											
Historia clínica, demografía, terapias anteriores para el cáncer	X											
Examen físico, altura y peso ³	X		X		X	X	X	X		X	X	X
Examen de las heces con guayacol	X ⁴											
Signos vitales ⁵	X		X		X	X	X	X		X	X	X
ECOG	X		X		X	X		X			X	X
ECG ⁷	X	X		X ⁶		X		X			X	X
FACT/GOG-NTX ⁷	X				X	X		X			X	X
MUGA o ECHO	X ⁸							X ⁸			X ⁸	
Administración de STM 434			X		X	X	X	X		X	X	
Administración de la dosis de doxorubicina liposomal ⁹			X			X		X			X	
Medicaciones concomitantes	X		X		X	X	X	X		X	X	X
Eventos adversos	X ¹⁰		X		X	X	X	X		X	X	X ¹¹
Hematología	X		X		X	X		X			X	X
Panel de coagulación (PT, PTT,	X		X		X	X		X			X	X

Apéndice 2. Procedimientos del estudio para STM 434 administrado Q2W (dosificación de STM 434 en los Días 1 y 15 de cada ciclo de 28 días)

Evaluación	Selección		Fase de tratamiento									Final del estudio ²
			Ciclo 1			Ciclos 2, 4, 6...		Ciclos 3, 5, 7...				
	Días -14 to 1	Día -1	Día 1 (-3 días)	Días 2, 3, 8	Día 15 (± 1 día)	Día 1 (± 3 días)	Día 15 (± 3 días)	Día 1 (± 3 días)	Día 2, 3, 8	Día 15 (± 3 días)	Discont. del tratamiento ¹	
INR, TT ¹² , D dímero ¹²)												
Química del suero	X		X		X	X		X			X	X
Glucosa en ayunas e insulina en ayunas	X							X			X	
HbA1c ¹³	X							X ¹³			X ¹³	X
Lípidos séricos	X							X			X	X
Biomarcadores tumorales séricos ¹⁴	X		X			X		X			X	X
Biomarcadores tumorales tisulares ¹⁵	X											
Análisis de orina (tira de prueba)	X											
Test de embarazo en sangre ¹⁶	X											
Activina A (libre y total)	X		X		X	X		X			X	X
CTCs	X ¹⁷					X ¹⁷						
FSH, estradiol (sujetos femeninos), testosterona (sujetos masculinos)	X		X		X	X		X			X	X
Laboratorio central DXA	X ¹⁸							X ¹⁹			X ¹⁹	
Test de caminata de 6	X					X ²⁰		X			X	

Apéndice 2. Procedimientos del estudio para STM 434 administrado Q2W (dosificación de STM 434 en los Días 1 y 15 de cada ciclo de 28 días)

Evaluación	Selección		Fase de tratamiento									Final del estudio ^{o2}
			Ciclo 1			Ciclos 2, 4, 6...		Ciclos 3, 5, 7...				
	Días -14 to 1	Día -1	Día 1 (-3 días)	Días 2, 3, 8	Día 15 (± 1 día)	Día 1 (± 3 días)	Día 15 (± 3 días)	Día 1 (± 3 días)	Día 2, 3, 8	Día 15 (± 3 días)	Discont. del tratamiento ¹	
minutos												
CT/MRI de cerebro en la selección	X											
CT/MRI de tórax/abdomen /pelvis	X ¹⁸							X ¹⁹			X ¹⁹	
Exploración ósea ²¹	X ¹⁸							X ¹⁹			X ¹⁹	
Evaluación del avance de la enfermedad ²²								X			X	
Anticuerpo anti-STM 434	X		X			X		X			X	X
PK pre-dosis			X ²³			X ²³	X ²³	X ²³		X ²³	X ²³	
PK posdosis			X ²³	X ²³	X ²³	X ²³			X ²³			

Notas al pie de página con referencia a los procedimientos del estudio

¹ La visita de discontinuación del tratamiento puede ocurrir en cualquier visita programada o no programada cuando sea apropiado. En esta visita, se requiere la documentación para confirmar el avance de la enfermedad o una toxicidad inaceptable.

² La visita de EOS debería ser programada 28 ± 3 días después de la última administración de STM 434.

³ El peso del sujeto es registrado en cada visita; la altura es registrada solamente en la visita de la selección.

⁴ El examen de guayacol en las heces se requiere en la selección y puede ser repetido a discreción del investigador poslínea de base.

⁵ Signos vitales: temperatura aural, transdérmica u oral, presión sanguínea sentado, frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria

⁶ Después de la visita de la selección, los ECGs tienen que ser realizados usando equipo del laboratorio central. A partir del Día -1 los sujetos llevarán un monitor Holter continuamente hasta la visita del Ciclo 1/Día 2, momento en el cual se retirará el monitor Holter. El Día 1 de cada uno de los ciclos subsiguientes y en la visita del EOS, se realizarán ECGs con 12 derivaciones con el equipo del laboratorio central.

⁷ El FACT/GOG-NTX puede ser realizado en visitas no programadas si se necesita para evaluar un AE de neuropatía.

⁸ Solamente los sujetos en la Parte 3 requieren MUGA o ECHO para documentar la fracción de eyección cardíaca para la administración de doxorubicina liposomal. La elección de MUGA o ECHO es a discreción del investigador, pero una vez que se selecciona una modalidad, debería usarse el mismo método para el sujeto durante todo el período del estudio. MUGA/ECHO debe realizarse solamente en la selección y en el Ciclo 3 Día 1. En caso de que un sujeto tratado con doxorubicina en la Parte 3 discontinúa antes del Ciclo 3 Día 1, debería realizarse un MUGA/ECHO en la visita de discontinuación del tratamiento.

⁹ La administración de doxorubicina liposomal está limitada a sujetos en la Parte 3 del estudio.

¹⁰ Los SAEs pretratamiento deberían ser informados a partir del momento en que se firma el documento de consentimiento informado hasta la administración de la medicación del estudio en el Ciclo 1 Día 1.

¹¹ Se requiere un seguimiento del AE durante 30 días después de la última administración de STM 434 para determinar si hay algún AE nuevo o SAEs independientemente de la atribución de causalidad. El seguimiento puede ser realizado por teléfono y debe ser documentado en las notas de origen.

¹² Selección y Ciclo 2 Día 1 solamente.

¹³ El HbA1c será recogido y analizado en la selección, en el Ciclo 3 Día 1, en la discontinuación del tratamiento y en el EOS solamente.

¹⁴ Los biomarcadores tumorales séricos pueden incluir CA-125, PSA, CA 19-9, CEA, u otros biomarcadores según sea apropiado en base al tipo de tumor del sujeto. Para los pacientes con tumores de las células de la granulosa, realizar MIS en el laboratorio central en el Día 1 de cada ciclo.

¹⁵ Los biomarcadores tumorales tisulares incluyen secciones del tumor / bloques del tumor para la expresión génica de ACVR2B e INHBA (todos los sujetos) así como también el estado de mutación génica (para los sujetos con tumores de las células claras / endometriales / de las células de la granulosa).

¹⁶ Mujeres con capacidad para tener hijos solamente.

¹⁷ Los CTCs serán realizados en la selección y en el Ciclo 2 Día 1 solamente.

¹⁸ Las exploraciones (DXA, CT, MRI, ósea) realizadas hasta 30 días antes del Ciclo 1 Día 1 se pueden usar para las evaluaciones de la línea de base.

¹⁹ Las exploraciones en estudio de DXA, CT/MRI y óseas pueden ser realizadas dentro de 14 días antes de la visita del Día 1. Después que se realizaron las exploraciones en la visita del Ciclo 7 Día 1, las exploraciones subsiguientes pueden ser realizadas cada cuarto ciclo si el investigador considera que la probabilidad de avance de la enfermedad es baja.

²⁰ La prueba de la caminata de 6 minutos será completada solamente en la visita del Ciclo 2 Día 1.

²¹ Las evaluaciones de las exploraciones óseas deberían ser realizadas a discreción del investigador, por ejemplo, si el sujeto tiene tumores metastásicos en los huesos.

²² El investigador debería evaluar las exploraciones radiográficas de acuerdo con RECIST 1.1 (Apéndice 7)

²³El esquema detallado para las evaluaciones PK se presenta en el Apéndice 5 de este protocolo. Notar que las evaluaciones PK del Día 2, 3, y 8 se realizan en el Ciclo 1 y el Ciclo 3 solamente.

Apéndice 3. Procedimientos del estudio para STM 434 administrado Q3W										
Evaluación	Selección		Fase de tratamiento							Final del estudio ²
			Ciclo 1			Ciclos 2, 4, 6...	Ciclos 3, 5, 7...			
	Días -14 to 1	Día -1	Día 1 (-3 días)	Días 2, 3, 8	Día 15 (± 1 día)	Día 1 (± 3 días)	Día 1 (± 3 días)	Día 2, 3, 8	Discontin. del tratamiento ¹	
Formulario de consentimiento firmado	X									
Historia clínica, demografía, terapias anteriores para el cáncer	X									
Examen físico, altura y peso ³	X		X			X	X		X	X
Examen de las heces con guayacol	X ⁴									
Signos vitales ⁵	X		X			X	X		X	X
ECOG	X		X			X	X		X	X
ECG ⁶	X	X		X ⁶		X	X		X	X
FACT/GOG-NTX ⁷	X					X	X		X	X
Administración de STM 434			X			X	X		X	
Medicaciones concomitantes	X		X			X	X		X	X
Eventos adversos	X ⁸		X			X	X		X	X ⁹
Hematología	X		X			X	X		X	X
Panel de coagulación (PT, PTT, INR, TT ¹⁰ , D-dímero ¹⁰)	X		X			X	X		X	X
Química del suero	X		X			X	X		X	X

Apéndice 3. Procedimientos del estudio para STM 434 administrado Q3W										
Evaluación	Selección		Fase de tratamiento							Final del estudio ²
			Ciclo 1			Ciclos 2, 4, 6...	Ciclos 3, 5, 7...			
	Días -14 to 1	Día -1	Día 1 (-3 días)	Días 2, 3, 8	Día 15 (± 1 día)	Día 1 (± 3 días)	Día 1 (± 3 días)	Día 2, 3, 8	Discontin. del tratamiento ¹	
Glucosa en ayunas e insulina en ayunas	X						X		X	
HbA1c ¹¹	X						X ¹¹		X ¹¹	X
Lípidos séricos	X						X		X	X
Biomarcadores tumorales séricos ¹²	X		X			X	X		X	X
Biomarcadores tumorales tisulares ¹³	X									
Análisis de orina (tira de prueba)	X									
Test de embarazo en sangre ¹⁴	X									
Activina A (libre y total)	X		X			X	X		X	X
CTCs	X ¹⁵					X ¹⁵				
FSH, estradiol (sujetos femeninos), testosterona (sujetos masculinos)	X		X			X	X		X	X
Laboratorio central DXA	X ¹⁶						X ¹⁷		X ¹⁷	
Test de caminata de 6 minutos	X					X ¹⁸	X		X	
CT/MRI de cerebro en la selección	X									

Apéndice 3. Procedimientos del estudio para STM 434 administrado Q3W										
Evaluación	Selección		Fase de tratamiento							Final del estudio ²
			Ciclo 1			Ciclos 2, 4, 6...	Ciclos 3, 5, 7...			
	Días -14 to 1	Día -1	Día 1 (-3 días)	Días 2, 3, 8	Día 15 (± 1 día)	Día 1 (± 3 días)	Día 1 (± 3 días)	Día 2, 3, 8	Discontin. del tratamiento ¹	
CT/MRI de tórax/abdomen /pelvis	X ¹⁶						X ¹⁷		X ¹⁷	
Exploración ósea ¹⁹	X ¹⁶						X ¹⁷		X ¹⁷	
Evaluación del avance de la enfermedad ²⁰							X		X	
Anticuerpo anti-STM 434	X		X			X	X		X	X
PK pre-dosis			X ²¹			X ²¹	X ²¹		X ²¹	
PK posdosis			X ²¹	X ²¹	X ²¹	X ²¹		X ²¹		

Notas al pie de página con referencia a los procedimientos del estudio

¹ La visita de discontinuación del tratamiento puede ocurrir en cualquier visita programada o no programada cuando sea apropiado. En esta visita, se requiere la documentación para confirmar el avance de la enfermedad o una toxicidad inaceptable.

² La visita de EOS debería ser programada 28 ± 3 días después de la última administración de STM 434.

³ El peso del sujeto es registrado en cada visita; la altura es registrada solamente en la visita de la selección.

⁴ El examen de guayacol en las heces se requiere en la selección y puede ser repetido a discreción del investigador poslínea de base.

⁵ Signos vitales: temperatura aural, transdérmica u oral, presión sanguínea sentado, frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria

⁶ Después de la visita de la selección, los ECGs tienen que ser realizados usando equipo del laboratorio central. A partir del Día -1 los sujetos llevarán un monitor Holter continuamente hasta la visita del Ciclo 1/Día 2, momento en el cual se retirará el monitor Holter. El Día 1 de cada uno de los ciclos subsiguientes y en la visita del EOS, se realizarán ECGs con 12 derivaciones con el equipo del laboratorio central.

⁷ El FACT/GOG-NTX puede ser realizado en visitas no programadas si se necesita para evaluar un AE de neuropatía.

⁸ Los SAEs pretratamiento deberían ser informados a partir del momento en que se firma el documento de consentimiento informado hasta la administración de la medicación del estudio en el Ciclo 1 Día 1.

⁹ Se requiere un seguimiento del AE durante 30 días después de la última administración de STM 434 para determinar si hay algún AE nuevo o SAEs independientemente de la atribución de causalidad. El seguimiento puede ser realizado por teléfono y debe ser documentado en las notas de origen.

¹⁰ Selección y Ciclo 2 Día 1 solamente.

¹¹ El HbA1c será recogido y analizado en la selección, en el Ciclo 3 Día 1, en la discontinuación del tratamiento y en el EOS solamente.

¹² Los biomarcadores tumorales séricos pueden incluir CA-125, PSA, CA 19-9, CEA, u otros biomarcadores según sea apropiado en base al tipo de tumor del sujeto. Para los pacientes con tumores de las células de la granulosa, realizar MIS en el laboratorio central en el Día 1 de cada ciclo.

¹³ Los biomarcadores tumorales tisulares incluyen secciones del tumor / bloques del tumor para la expresión génica de ACVR2B e INHBA (todos los sujetos) así como también el estado de mutación génica (para los sujetos con tumores de las células claras / endometriales / de las células de la granulosa).

¹⁴ Mujeres con capacidad para tener hijos solamente.

¹⁵ Los CTCs serán realizados en la selección y en el Ciclo 2 Día 1 solamente.

¹⁶ Las exploraciones (DXA, CT, MRI, ósea) realizadas hasta 30 días antes del Ciclo 1 Día 1 se pueden usar para las evaluaciones de la línea de base.

¹⁷ Las exploraciones en estudio de DXA, CT/MRI y óseas pueden ser realizadas dentro de 14 días antes de la visita del Día 1. Después que se realizaron las exploraciones en la visita del Ciclo 7 Día 1, las exploraciones subsiguientes pueden ser realizadas cada cuarto ciclo si el investigador considera que la probabilidad de avance de la enfermedad es baja.

¹⁸ La prueba de la caminata de 6 minutos será completada solamente en la visita del Ciclo 2 Día 1.

¹⁹ Las evaluaciones de las exploraciones óseas deberían ser realizadas a discreción del investigador, por ejemplo, si el sujeto tiene tumores metastásicos en los huesos.

²⁰ El investigador debería evaluar las exploraciones radiográficas de acuerdo con RECIST 1.1 (Apéndice 7)

²¹El esquema detallado para las evaluaciones PK se presenta en el Apéndice 6 de este protocolo. Notar que las evaluaciones PK del Día 2, 3, y 8 se realizan en el Ciclo 1 y el Ciclo 3 solamente.

Apéndice 4. Esquema de evaluación farmacocinética para la administración Q4W de STM 434				
Ciclo y Día	Parte 1 (Aumento de la dosis)	Parte 2 (Expansión de la dosis en monoterapia)	Parte 3 (STM 434 + doxorrubicina liposomal)	
	Muestreo de 434^a	Muestreo de STM 434^a	Muestreo de STM 434^a	Muestreo de doxorrubicina / Doxorrubicinol^b
Ciclo 1 Día 1	Predosis Final de la infusión	Predosis Final de la infusión	Predosis Final de la infusión	Predosis Final de la infusión 1, 2, 3, 4, 6 hs después de la

	1, 2, 6 hs después de la infusión	1, 2, 6 hs después de la infusión	1, 2, 6 hs después de la infusión	infusión
Ciclo 1 Día 2	24 hs después de la infusión	—	24 hs después de la infusión	24 h después de la infusión
Ciclo 1 Día 3	48 hs después de la infusión	—	48 hs después de la infusión	48 hs después de la infusión
Ciclo 1 Día 8	168 hs después de la infusión	—	168 hs después de la infusión	168 hs después de la infusión
Ciclo 1 Día 15	336 hs después de la infusión	336 hs después de la infusión	336 hs después de la infusión	336 hs después de la infusión
Ciclo 2 Día 1	672 hs después del Ciclo 1 Final de la infusión Ciclo 2	672 hs después del Ciclo 1 Final de la infusión Ciclo 2	672 hs después del Ciclo 1 Final de la infusión Ciclo 2	Final Ciclo 1/Predosis Ciclo 2 Final de la infusión Ciclo 2
Ciclo 3 Día 1	672 hs después de Ciclo 2 Final de la infusión Ciclo 3 1, 2, 6 hs después de la infusión	672 hs después de Ciclo 2 Final de infusión Ciclo 3 1, 2, 6 hs después de infusión	672 hs después de Ciclo 2 Final de la infusión Ciclo 3 1, 2, 6 hs después de la infusión	Final Ciclo 2/Predosis Ciclo 3 Final de la infusión Ciclo 3 1, 2, 3, 4, 6 hs después de la infusión
Ciclo 3 Día 2	24 hs después de la infusión	—	24 hs después de la infusión	24 hs después de la infusión
Ciclo 3 Día 3	48 hs después de la infusión	—	48 hs después de la infusión	48 hs después de la infusión
Ciclo 3 Día 8	168 hs después de la infusión	—	168 hs después de infusión	168 hs después de la infusión
Ciclo 3 Día 15	336 hs después de la infusión	336 hs después de la infusión	336 hs después de la infusión	336 hs después de la infusión
Ciclo 4 Día 1	672 hs después de Ciclo 3 Final de la infusión Ciclo 4	672 hs después de Ciclo 3 Final de la infusión Ciclo 4	672 hs después de Ciclo 3 Final de infusión	Final Ciclo 3/Predosis Ciclo 4 Final de la infusión Ciclo 4

			Ciclo 4	
Ciclo 5 Día 1	672 hs después de Ciclo 4 Final de la infusión Ciclo 5	672 hs después de Ciclo 4 Final de la infusión Ciclo 5	672 hs después de Ciclo 4 Final de la infusión Ciclo 5	672 hs después de Ciclo 4 Final de la infusión Ciclo 5
Discontinuación del tratamiento	672 hs después de la infusión final	—	672 hs después de la infusión final	672 h después de la infusión final

^a Todos los tiempos de muestreo de STM 434 son relativos a la dosificación de STM 434.

^b Todos los tiempos de muestreo de doxorubicina/doxorubicinol son relativos a la dosificación de doxorubicina liposomal.

Para la dosificación Q4W, las ventanas de muestreo PK posdosis son como sigue:

Ciclo 1 Día 1: $\pm$ 30 minutos Días 2, 3, 8: $\pm$ 4 horas Día 15: $\pm$ 1 día

Ciclo 2 Día 1: $\pm$ 30 minutos

Ciclo 3 Día 1: $\pm$ 30 minutos Días 2, 3, 8: $\pm$ 4 horas Día 15: $\pm$ 1 día

Ciclo 4 Día 1: $\pm$ 30 minutos

Ciclo 5 Día 1: $\pm$ 30 minutos

Apéndice 5. Esquema de evaluación farmacocinética para la administración Q2W de STM 434 (Dosificación de STM 434 en los Días 1 y 15 de cada ciclo de 28 días)				
Ciclo y Día	Parte 1 (Aumento de la dosis)	Parte 2 (Expansión de la dosis de monoterapia)	Parte 3 (STM 434 + doxorubicina liposomal)	
	Muestreo de STM 434^a	Muestreo de STM 434^a	Muestreo de STM 434^a	Muestreo de Doxorubicina/Doxorubicinol^b
Ciclo 1 Día 1	Predosis Final de la infusión 1, 2, 6 hs después de la infusión	Predosis Final de la infusión 1, 2, 6 hs después de la infusión	Predosis Final de la infusión 1, 2, 6 hs después de la infusión	Predosis Final de la infusión 1, 2, 3, 4, 6 hs después de la infusión
Ciclo 1 Día 2	24 hs después de la infusión	—	24 hs después de la infusión	24 hs después de la infusión
Ciclo 1 Día 3	48 hs después de la infusión	—	48 hs después de la infusión	48 hs después de la infusión
Ciclo 1 Día 8	168 hs	—	168 h	168 hs después de la infusión

	después de la infusión		después de la infusión	
Ciclo 1 Día 15	Predosis	Predosis	Predosis	Predosis
Ciclo 2 Día 1	Predosis Ciclo 2	Predosis Ciclo 2	Predosis Ciclo 2	Predosis Ciclo 2
Ciclo 2 Día 15	Predosis	Predosis	Predosis	—
Ciclo 3 Día 1	Predosis Ciclo 3 Final de la infusión Ciclo 3 1, 2, 6 hs después de la infusión Ciclo	Predosis Ciclo 3 Final de la infusión Ciclo 3 1, 2, 6 hs después de la infusión Ciclo	Predosis Ciclo 3 Final de la infusión Ciclo 3 1, 2, 6 hs después de la infusión Ciclo	Predosis Ciclo 3 Final de la infusión Ciclo 3 1, 2, 3, 4, 6 hs después de la infusión
Ciclo 3 Día 2	24 hs después de la infusión	—	24 hs después de la infusión	24 hs después de la infusión
Ciclo 3 Día 3	48 hs después de la infusión	—	48 hs después de la infusión	48 hs después de la infusión
Ciclo 3 Día 8	168 hs después de la infusión	—	168 hs después de la infusión	168 hs después de la infusión
Ciclo 3 Día 15	Predosis	Predosis	Predosis	Predosis
Ciclo 4 Día 1	Predosis Ciclo 4	Predosis Ciclo 4	Predosis Ciclo 4	Predosis Ciclo 4
Ciclo 4 Día 15	Predosis	Predosis	Predosis	Predosis
Ciclo 5 Día 1	Predosis Ciclo 5 Final de la infusión Ciclo 5	Predosis Ciclo 5 Final de la infusión Ciclo 5	Predosis Ciclo 5 Final de la infusión Ciclo 5	Predosis Ciclo 5 Final de la infusión Ciclo 5
Discontinuación del tratamiento	672 hs después de la infusión final	—	672 hs después de la infusión final	672 h después de la infusión final

^a Todos los tiempos de muestreo de STM 434 son relativos a la dosificación de STM 434.

^b Todos los tiempos de muestreo de doxorubicina/doxorubicinol son relativos a la dosificación de la doxorubicina.

Para la dosificación Q2W, las ventanas del muestreo PK posdosis son como sigue:

Ciclo 1 Día 1: ± 30 minutos Días 2, 3, 8: ± 4 horas Día 15: dentro de 1 día antes de la dosificación

Ciclos 2, 4 Día 1: ± 4 horas Día 15: dentro de 1 día antes de la dosificación
Ciclo 3 Día 1: ± 30 minutos Días 2, 3, 8: ± 4 horas Día 15: dentro de 1 día antes de la dosificación
Ciclo 5 Día 1: ± 30 minutos

Apéndice 6. Esquema de evaluación farmacocinética para la administración Q3W de STM 434 (Dosificación de STM 434 en el Día 1 cada ciclo de 21 días)		
Ciclo y Día	Parte 1 (Aumento de la dosis)	Parte 2 (Expansión de dosis de la monoterapia)
	Muestreo de STM 434^a	Muestreo de STM 434^a
Ciclo 1 Día 1	Predosis Final de la infusión 1, 2, 6 hs después de la infusión	Predosis Final de la infusión 1, 2, 6 hs después de la infusión
Ciclo 1 Día 2	24 hs después de la infusión	—
Ciclo 1 Día 3	48 hs después de la infusión	—
Ciclo 1 Día 8	168 hs después de la infusión	—
Ciclo 1 Día 15	336 hs después de la infusión	336 h después de la infusión
Ciclo 2 Día 1	Predosis Ciclo 2	Predosis Ciclo 2
Ciclo 3 Día 1	Predosis Ciclo 3 Final de la infusión Ciclo 3 1, 2, 6 hs después de la infusión Ciclo 3	Predosis Ciclo 3 Final de la infusión Ciclo 3 1, 2, 6 h después de la infusión Ciclo 3
Ciclo 3 Día 2	24 hs después de la infusión	—
Ciclo 3 Día 3	48 hs después de la infusión	—
Ciclo 3 Día 8	168 hs después de la infusión	—
Ciclo 4 Día 1	Predosis Ciclo 4	Predosis Ciclo 4
Ciclo 5 Día 1	Predosis Ciclo 5 Final de la infusión Ciclo 5	Predosis Ciclo 5 Final de la infusión Ciclo 5
Discontinuación del tratamiento	672 hs después de la infusión final	—

^a Todos los tiempos de muestreo de STM 434 son relativos a la dosificación de STM 434. Para la dosificación Q3W, las ventanas del muestreo PK posdosis son como sigue:

Ciclo 1 Día 1: ± 30 minutos Días 2, 3, 8: ± 4 horas Día 15: ± 1 día
Ciclo 2 Día 1: ± 4 horas
Ciclo 3 Día 1: ± 30 minutos Días 2, 3, 8: ± 4 horas
Ciclo 4 Día 1: ± 4 horas
Ciclo 5 Día 1: ± 30 minutos

Ejemplo 7: Estabilidad del STM 434.

[00335] Se determinó la estabilidad del STM 434 formulado mediante diversos métodos en diversos instantes de tiempo bajo diversas condiciones. Se formuló el STM 434 como se describe en lo que precede (la inyección de STM 434 se formuló como 70 mg/mL de STM 434, 10 mM de fosfato de potasio, 8,8% (peso/volumen) de sacarosa, 0,006% (peso/volumen) de polisorbato 20, pH 6,7).

Métodos

[00336] Los métodos analíticos utilizados para evaluar la estabilidad fueron como sigue:

[00337] Concentración mediante absorción de radiación ultravioleta (UV)

[00338] Se midió la concentración de STM 434 en el producto fármaco mediante un espectrofotómetro de UV. Se utilizaron la absorción de luz a 280 nm (A_{280}) y el coeficiente de extinción a 280 nm (ϵ_{280}) de $1,7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para determinar la concentración sobre la base de la Ley de Beer.

[00339] Se considera que una proteína en un instante de tiempo determinado y bajo una temperatura dada tiene una estabilidad equivalente a la de la proteína en el instante cero (T_0) o a la de una proteína idéntica, bajo condiciones por demás idénticas, a -70°C cuando la concentración es de $70,0 \pm 7,0 \text{ mg/mL}$. También es posible calcular la estabilidad porcentual de una proteína dada en un instante de tiempo dado con referencia a este número.

[00340] Aspecto visual

[00341] Este método permite la evaluación visual de la inyección de STM 434. Se observó un frasco bajo luz ambiente, y se informó sobre el aspecto general en base a las partículas visibles, grado de coloración, y claridad.

[00342] Se considera que una proteína en un instante de tiempo dado y bajo una temperatura determinada tiene una estabilidad equivalente a la de la proteína en el instante cero (T_0) o a la de una proteína idéntica, bajo condiciones por demás idénticas, a -70°C , cuando el aspecto es el de un líquido límpido, de incoloro a ligeramente amarillento, y se halla esencialmente libre de partículas.

[00343] Osmolaridad

[00344] Se midió la osmolaridad de la inyección de STM 434 mediante un osmómetro de depresión de punto de congelación, que fue calibrado con respecto a un estándar de osmolaridad de 290 mOsm/kg.

[00345] Se considera que una proteína en un instante de tiempo dado y bajo una temperatura determinada tiene una estabilidad equivalente a la de la proteína en el instante

cero (T0) o a la de una proteína idéntica, bajo condiciones por demás idénticas, a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, cuando la osmolaridad es de $330,0 \pm 50,0\text{ mOsm/kg}$. El porcentaje de estabilidad de una proteína dada en un instante de tiempo dado también puede calcularse con referencia a este número.

[00346] pH

[00347] Se midió el pH de la inyección de STM 434 mediante un medidor de pH calibrado en base a los estándares rastreables del National Institute of Science and Technology (NIST).

[00348] Se considera que una proteína en un instante de tiempo dado y bajo una temperatura determinada tiene una estabilidad equivalente a la de la proteína en el instante cero (T0) o a la de una proteína idéntica, bajo condiciones por demás idénticas, a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, cuando el pH es de $6,7 \pm 0,3$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. El porcentaje de estabilidad de una proteína dada en un instante de tiempo dado también puede calcularse con referencia a este número.

[00349] Volumen en el Contenedor

[00350] Se midió el volumen de la inyección de STM 434 en los frascos.

[00351] Se considera que una proteína en un instante de tiempo dado y bajo una temperatura determinada tiene una estabilidad equivalente a la de la proteína en el instante cero (T0) o a la de una proteína idéntica, bajo condiciones por demás idénticas, a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, cuando el volumen en el contenedor no es inferior a $1,0\text{ mL}$. El porcentaje de estabilidad de una proteína dada en un instante de tiempo dado también puede calcularse con referencia a este número.

[00352] Cromatografía Líquida por Exclusión de Tamaño de Elevada Performance (SE-HPLC, Size Exclusion High Performance Liquid Chromatography)

[00353] El SE-HPLC es un método para separar proteínas de acuerdo con su tamaño hidrodinámico, que está relacionada de manera aproximado con su peso molecular (MW, molecular weight). El SE-HPLC permite el análisis de la distribución de los tamaños moleculares del STM 434 en el producto fármaco, especialmente con respecto a la agregación, fragmentación, y otras impurezas. La resolución del STM434 monomérico con respecto a otras especies mediante el SE-HPLC fue llevada en una columna de HPLC TSKgel G3000SWxl HPLC, utilizándose una fase móvil isocrática de 100 mM de fosfato de sodio, 250 mM de cloruro de sodio, pH 6,8, con un caudal de $0,5\text{ mL/min}$. Las especies de proteína fueron detectadas a $A_{280\text{ nm}}$ a lo largo de un tiempo de pasada de ensayo de 35 minutos. El tiempo de elución de las proteínas fue inversamente proporcional al log de su MW. Los

resultados del ensayo han sido consignados como porcentaje de área de pico de A280 referido al área total del pico A280.

[00354] Se considera que una proteína en un instante de tiempo dado y bajo una temperatura determinada tiene una estabilidad equivalente a la de la proteína en el instante cero (T0) o a la de una proteína idéntica, bajo condiciones por demás idénticas, a -70°C , cuando el pico principal de SE-HPLC es igual o superior al 95,0%. El porcentaje de estabilidad de una proteína dada en un instante de tiempo dado también puede calcularse con referencia a este número.

[00355] Enfocado capilar isoelectrico mediante formación de imágenes (icIEF, Imaged Capillary Isoelectric Focusing)

[00356] El cIEF es una técnica de alta resolución para la separación de proteínas basada en diferencias en los puntos isoelectricos (pI, isoelectric point) entre las proteínas. El sistema analizador Protein Simple (anteriormente: Convergent Bioscience) iCE280 IEF utiliza un detector formador de imágenes de zona capilar entera que permite un análisis sin el paso de movilización requerido para los instrumentos de cIEF convencionales. Con respecto a la inyección de STM 434, se utilizó el icIEF como una prueba de pureza.

[00357] En este método de icIEF, unas muestras de STM 434 fueron tratadas con sialidasa a efectos de reducir la complejidad impartida por los variados niveles de ácido siálico en el producto. Después de la desialilación, las muestras fueron mezcladas con anfolitos portadores a efectos de generar un gradiente de pH, con metilcelulosa para reducir el flujo electroosmótico, y con marcadores de pI conocido que absorben la luz de 280 nm. La mezcla fue introducida en capilares de sílice revestidos interiormente con un segmento transparente a la radiación ultravioleta entre depósitos de entrada y de salida ensamblados en un cartucho. Cuando se aplica un voltaje al segmento capilar, la solución forma un gradiente de pH, en el que los anfolitos, los marcadores de pI, y las especies de proteínas presentes en la muestra fueron enfocados en sus respectivos pI. Se tomó una imagen de absorción capilar completa con una cámara del dispositivo acoplada a carga, lo que permite la supervisión de las zonas enfocadas en el capilar a 280 nm, correspondiente a las diversas especies de proteína y a los marcadores de pI. La inclusión de los marcadores de pI permite la calibración del gradiente de pI en los capilares, lo que provee una determinación reproducible de los valores de pI de las diversas especies presentes en una muestra. De manera comparable con el HPLC, los resultados del icIEF se proveen como picos A280 como una función de la distancia de

migración en los capilares. Los resultados del ensayo se consignan como porcentaje de área de pico A280 referido al área de pico total A280 para las especies de proteína.

[00358] Se considera que una proteína en un instante de tiempo dado y bajo una temperatura determinada tiene una estabilidad equivalente a la de la proteína en el instante cero (T0) o a la de una proteína idéntica, bajo condiciones por demás idénticas, a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, cuando el pico principal de icIEF es del $65,0 \pm 10,0\%$. El porcentaje de estabilidad de una proteína dada en un instante de tiempo dado también puede calcularse con referencia a este número.

[00359] Electroforesis capilar con dodecilfosfato de sodio (CE–SDS, Sodium Dodecyl Sulfate Capillary Electrophoresis), no reducido (nrCE–SDS)

[00360] Se utilizó el CE–SDS, no reducido, como un ensayo de pureza para la inyección de STM 434. La metodología implica la desnaturalización térmica de proteínas en la presencia del SDS detergente, que se liga a polipéptidos con una relación SDS: polipéptido relativamente constante. El SDS cargado negativamente ligado a las proteínas hace que éstas migren en un campo eléctrico de acuerdo con su MW.

[00361] En este método, unas muestras de STM 434 fueron incubadas a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos con SDS, un agente del bloqueo sulfhidrilo libre, y un estándar de MW interno bajo condiciones no reductoras. Después de la incubación, las muestras tratadas fueron introducidas en un automuestreador, que también llevaba soluciones de enjuagues y un gel de SDS especializado. El sistema de CE fue programado para enjuagues secuenciales, carga con gel, e inyecciones de muestras electrocinética en un capilar de sílice fusionado desnudo. Para cada muestra, las proteínas inyectadas fueron sometidas a un campo eléctrico para su separación en base a sus MW, incluyéndose la movilización a través de una ventana del detector, donde el recubrimiento del capilar había sido removido y se hizo pasar la luz a través del capilar hacia un detector de un conjunto ordenado de fotodiodos, que en este método había sido ajustado para recolectar la absorción a 220 nm (A220). Los resultados del ensayo fueron informados como porcentaje de área del pico de A220 referido al área de pico A280 total para las especies de proteína.

[00362] Se considera que una proteína en un instante de tiempo dado y bajo una temperatura determinada tiene una estabilidad equivalente a la de la proteína en el instante cero (T0) o a la de una proteína idéntica, bajo condiciones por demás idénticas, a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, cuando el pico principal de nrCE–SDS es igual o superior a $88,0\%$. El porcentaje de

estabilidad de una proteína dada en un instante de tiempo dado también puede calcularse con referencia a este número.

[00363] CE–SDS, reducido (rCE–SDS)

[00364] El CE–SDS, reducido fue utilizado como una prueba de pureza para la inyección de STM 434. La metodología implica la desnaturalización térmica de una concentración especificada de proteína en la presencia del SDS detergente, y de un agente de reducción que desdobra los enlaces disulfuro en forma de sulfhidrilos libres, que en el caso del STM 434 causa la separación de las dos cadenas polipeptídicas del homodímero. El SDS cargado negativamente, que se une a cadenas polipeptídicas con una relación SDS: polipéptido relativamente constante, hace que los polipéptidos migren en un campo eléctrico de acuerdo con su MW.

[00365] En este método, unas muestras de STM 434 fueron incubadas a 70 °C durante 10 minutos con SDS, el agente reductor, β –mercaptoetanol, y un estándar de MW interno bajo condiciones no reductoras. Después de la incubación, las muestras tratadas fueron introducidas en un automuestreador, que también llevaba soluciones de enjuagues y un gel de SDS especializado. El sistema de CE fue programado para enjuagues secuenciales, carga con gel, e inyecciones de muestras electrocinéticas en un capilar de sílice fusionado desnudo. Para cada muestra, las proteínas inyectadas fueron sometidas a un campo eléctrico para su separación en base a sus MW, incluyéndose la movilización a través de una ventana del detector, donde el recubrimiento del capilar había sido removido y se hizo pasar la luz a través del capilar hacia un detector de un conjunto ordenado de fotodiodos, que en este método había sido ajustado para recolectar la absorción a 220 nm (A220). Los resultados del ensayo fueron informados como porcentaje de área del pico de A220 referido al área de pico A280 total para las especies de proteína.

[00366] Se considera que una proteína en un instante de tiempo dado y bajo una temperatura determinada tiene una estabilidad equivalente a la de la proteína en el instante cero (T0) o a la de una proteína idéntica, bajo condiciones por demás idénticas, a –70 °C, cuando el pico principal de rCE–SDS es igual o superior al 90,0%. El porcentaje de estabilidad de una proteína dada en un instante de tiempo dado también puede calcularse con referencia a este número.

[00367] ELISA específico para el producto

[00368] La metodología utilizada en el ensayo de identidad de la inyección de STM 434 fue un ELISA de sándwich de fase sólida. Unas tiras de microtitulación fueron recubiertas con

anticuerpo monoclonal anti–STM 217, que tiene una elevada afinidad con respecto al STM 434 por cuanto estas proteínas difieren en un único aminoácido (serina–20 en STM 217, treonina–20 en STM 434). En secuencia, unas muestras o controles fueron añadidos a las cavidades, seguido por un anticuerpo monoclonal biotinilado generado contra ActR2B humano, seguido por un conjugado de Neutravidin–Peroxidasa de rábano picante (HRP). El STM 434 presente en las muestras se une al anticuerpo de captura inmovilizado y al anticuerpo secundario biotinilado, y el Neutravidin–HRP une este complejo por intermedio de la elevada afinidad de la avidina con respecto a la biotina. La parte de HRP del complejo cataliza la conversión del sustrato cromogénico tetrametilbencidina (TMB) a un producto que absorbe la luz de 450 nm. Se confirmó la identidad en muestras cuya relación entre señal y ruido, igual al A450 corregido en función del segundo plano de la muestra dividido por el A450 de cavidades en blanco corregido con respecto al segundo plano, no era inferior a 10,0.

[00369] Se considera que una proteína en un instante de tiempo dado y bajo una temperatura determinada tiene una estabilidad equivalente a la de la proteína en el instante cero (T0) o a la de una proteína idéntica, bajo condiciones por demás idénticas, a –70 °C, cuando el ELISA confirma la identidad de la proteína, por ejemplo con respecto a un control positivo. El porcentaje de estabilidad de una proteína dada en un instante de tiempo dado también puede calcularse con referencia al número para 450 nm determinado mediante el ELISA.

[00370] Ensayo Basado en células (Bioensayo)

[00371] Se midió la potencia de la inyección de STM 434 en un ensayo de expresión de gen de informante para lo cual se utilizó la línea de células de esqueleto muscular C2C12 pMARE clon #44. Unas células murinas C2C12 fueron transfectadas de manera estable con un constructo de luciferasa que responde a miostatina/activina humana. Cuando la línea de células diseñadas fue sometida a incubación con el ligando miostatina, tuvo lugar la transducción seguida por la unión de la miostatina a los receptores de activina. Esto tuvo como resultado la activación del gen informante de la luciferasa y la producción resultante de luciferasa. La reacción de la luciferasa con luciferina tuvo como resultado una luminiscencia que fue medida en un luminómetro. El STM 434 inhibe esta señalización de una manera que depende de la dosis. Los datos fueron analizados mediante un modelo de ajuste de curvas de cuatro parámetros. Una vez que se estableció el paralelismo/similitud con la curva de referencia, las concentraciones biológicas fueron interpoladas a partir de la curva y se calculó la potencia relativa de la muestra versus el estándar de referencia.

[00372] Se considera que una proteína en un instante de tiempo dado y bajo una temperatura determinada tiene una estabilidad equivalente a la de la proteína en el instante cero (T0) o a la de una proteína idéntica, bajo condiciones por demás idénticas, a -70°C , cuando el bioensayo muestra una potencia relativa del 60 al 140%. El porcentaje de estabilidad o de actividad de una proteína dada en un instante de tiempo dado también puede calcularse con referencia a este número.

[00373] Endotoxina

[00374] El método para cuantificar la endotoxina bacteriana en la inyección de STM 434 utilizó un sistema de detección cinético cromogénico para la detección de la endotoxina. Se prepararon unas series de diluciones de estándar de endotoxina, muestras de STM 434, y muestras de STM 434 salpicadas con estándar de endotoxina para la aptitud del sistema, y se las cargó en una placa de 96 cavidades, junto con agua como un blanco para la aptitud del sistema. Después de someter a incubación la placa a 37°C durante 10 minutos, a las cavidades se añadió reactivo Limulus amebocyte lisato (LAL) que contenía un péptido etiquetado con p-nitroanilina (pNA). La endotoxina presente en las muestras y en los estándares convirtieron una proenzima en LAL en una enzima reactiva que desdobló el pNA del péptido incoloro de manera de generar una señal a una absorción de 405 nm (A405). Los A405 de los estándares de endotoxina fueron graficados de manera de generar una curva estándar, y se determinó el contenido de endotoxina de las muestras de STM 434 a partir sus lecturas a A405 vs la curva estándar. Los resultados han sido consignados en términos de unidades de endotoxina por miligramo (EU/mg) después de determinar el EU/ml de cada muestra y de dividir por la concentración de la proteína en la muestra en mg/mL.

[00375] Se considera que una proteína en un instante de tiempo dado y bajo una temperatura determinada tiene una estabilidad equivalente a la de la proteína en el instante cero (T0) o a la de una proteína idéntica, bajo condiciones por demás idénticas, a -70°C , cuando el nivel de la endotoxina es inferior o igual a 0,5 unidades de endotoxina (EU)/mg. El porcentaje de estabilidad de una proteína dada en un instante de tiempo dado también puede calcularse con referencia a este número.

[00376] Esterilidad

[00377] El método para determinar la esterilidad de la inyección de STM 434 utilizó una técnica de filtración por membrana para retener cualesquiera microorganismos presentes en los artículos sometidos a ensayo.

[00378] Se considera que una proteína en un instante de tiempo dado y bajo una temperatura determinada tiene una estabilidad equivalente a la de la proteína en el instante cero (T0) o a la de una proteína idéntica, bajo condiciones por demás idénticas, a -70°C , cuando la esterilidad del producto satisface los requerimientos de la United States Pharmacopeia. El porcentaje de estabilidad de una proteína dada en un instante de tiempo dado también puede calcularse con referencia a estos números provistos en la United States Pharmacopeia.

[00379] Partículas subvisibles

[00380] La cantidad de partículas subvisibles en la inyección de STM 434 se determinó mediante oscurecimiento de la luz. Los resultados se han consignado como el número de partículas con diámetros de $10\text{ }\mu\text{m}$ o superiores, y con diámetros de $25\text{ }\mu\text{m}$ o superiores.

[00381] Se considera que una proteína en un instante de tiempo dado y bajo una temperatura determinada tiene una estabilidad equivalente a la de la proteína en el instante cero (T0) o a la de una proteína idéntica, bajo condiciones por demás idénticas, a -70°C , cuando no haya más de 6.000 partículas con un diámetro superior o igual a $10\text{ }\mu\text{m}$ por contenedor y cuando no haya más de 600 partículas superiores o iguales a $25\text{ }\mu\text{m}$ por contenedor. El porcentaje de estabilidad de una proteína dada en un instante de tiempo dado también puede calcularse con referencia a estos números.

[00382] Concentración del polisorbato 20

[00383] Se determinó la concentración del polisorbato 20 (PS20) en la inyección de STM 434 mediante un método que utiliza una pasada en una columna de HPLC de modo mixto en el modo de fase inversa para separar el PS20 de la proteína, con una detección cuantitativa mediante detección de aerosol cargado (CAD, charged aerosol detection). Una secuencia de inyecciones de estándares de PS20 provee una curva de calibración basada en las respuestas de CAD corregidas en cuanto a línea de base con una función de la concentración de PS0, que se ajusta a un polinomio de segundo orden. La concentración de PS20 informada de una muestra de STM 434 fue determinada ingresando las respuestas de CAD corregidas en su línea de base en la ecuación polinómica, y resolviendo de manera de obtener la concentración del PS20.

[00384] Se considera que una proteína en un instante de tiempo dado y bajo una temperatura determinada tiene una estabilidad equivalente a la de la proteína en el instante cero (T0) o a la de una proteína idéntica, bajo condiciones por demás idénticas, a -70°C , cuando la concentración del Polisorbato 20 es de $0,006 \pm 0,003\%$ (peso/volumen). El

porcentaje de estabilidad de una proteína dada en un instante de tiempo dado también puede calcularse con referencia a este número.

Resultados

[00385] Las siguientes tablas (Tablas 18–39) muestran datos relacionados con la estabilidad del STM434 formulado generados mediante los métodos anteriormente descritos, por menos en parte, en los instantes de tiempo indicados y bajo las condiciones indicadas.

[00386] La Tabla 18 muestra que las características ensayadas del 434 ensayado mantenido a 5 °C durante hasta 54 meses son similares al 434 formulado mantenido a –70 °C durante hasta 54 meses. La Tabla 22 muestra que las características ensayadas del 434 formulado mantenido a 5 °C durante hasta 6 meses son similares a las características del 434 formulado mantenido a 5 °C durante 0 meses. Las Tablas 25 y 30 muestran que las características ensayadas del 434 formulado mantenido a una temperatura de 2–8 °C durante hasta 12 meses son similares a las características del 434 formulado mantenido a una temperatura de 2–8 °C durante 0 meses. La Tabla 36 muestra que las características ensayadas del 434 formulado mantenido en una posición erguida a una temperatura de 2–8 °C durante hasta 6 meses, son similares a las características del 434 formulado mantenido en una posición erguida a una temperatura de 2–8 °C durante 0 meses. La Tabla 37 muestra que las características ensayadas del 434 formulado mantenido en una posición invertida a una temperatura de 2–8 °C durante hasta 6 meses, son similares a las características del 434 formulado mantenido en una posición invertida a una temperatura de 2–8 °C durante 0 meses.

[00387] Estos datos demuestran que el STM 434 formulado es sumamente estable durante hasta 54 meses a temperaturas refrigeradas (por ejemplo, de 2–8 °C (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 °C); 5 °C) y aun en concentraciones elevadas tales como 70 mg/mL. Este nivel de estabilidad es muy superior a la estabilidad prevista para las proteínas mantenidas a 4°C, que típicamente se halla en el intervalo de 1 mes. Al respecto, véase Pierce Technical Resource TR0043, 1, *Protein Stability and Storage*, en la Tabla 1 (http://sites.bio.indiana.edu/~chenlab/protocol_files/protein_storage.pdf); y Webster et al., *Predicting Long-Term Storage Stability of Therapeutic Proteins*, Pharmaceutical Technology, Volume 37, Issue 11 (Nov. 2, 2013). Por lo tanto, el STM 434 es una composición sumamente estable que puede ser almacenada a temperaturas refrigeradas (por ejemplo, de 2–8 °C) durante un intervalo de tiempo prolongado superior a 1 mes, por ejemplo, durante hasta 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48, o 54 meses o más..

Tabla 18: Resultados de ensayos de estabilidad sobre muestras de 434 DP/DS

	Muestra	DP, 5 °C	DP, -20 °C	DP, -70 °C	DS, 5 °C	DS, -70 °C
	Lote #	0010036965	0010036965	0010036965	0010035106	0010035106
Método	Instante de tiempo	54 meses	54 meses	54 meses	54 meses	54 meses
Aspecto visual		Incoloro, límpido, sin partículas visibles	Incoloro, límpido, sin partículas visibles	Incoloro, límpido, sin partículas visibles	Incoloro, límpido, sin partículas visibles	Incoloro, límpido, sin partículas visibles
pH		6,7	6,7	6,7	6,8	6,7
Concentración de proteína (A280)		71,6 mg/mL	71,3 mg/mL	71,8 mg/mL	76,0 mg/mL	71,5 mg/mL
SE-HPLC		98,2% Pk Principal 1,5% HMW 0,3% LMW	98,6% Pk Principal 1,4% HMW 0,0% LMW	98,8% Pk Principal 1,2% HMW 0,0% LMW	98,2% Pk Principal 1,5% HMW 0,3% LMW	98,8% Pk Principal 1,2% HMW 0,0% LMW
icIEF		60,8% Pk Principal 22,9% APG 16,4% BPG	69,9% Pk Principal 14,8% APG 15,3% BPG	72,4% Pk Principal 15,5% APG 12,2% BPG	65,6% Pk Principal 24,7% APG 9,8% BPG	65,8% Pk Principal 20,6% APG 13,7% BPG

nrCE–SDS		94,1% Pk Principal 5,9% Prepico	94,2% Pk Principal 5,8% Prepico	94,7% Pk Principal 5,3% Prepico	94,5% Pk Principal 5,5% Prepico	94,4% Pk Principal 5,6% Prepico
rCE–SDS		98,0% Pk Principal	98,0% Pk Principal	97,8% Pk Principal	97,7% Pk Principal	97,8% Pk Principal
Bioensayo basado en células		87% de Potencia Relativa	99% de Potencia Relativa	111% de Potencia Relativa	101% de Potencia Relativa	99% de Potencia Relativa
DP es producto fármaco; DS es sustancia fármaco						

Tabla 19: Síntesis de datos de la estabilidad de la inyección de STM 434, Lote 0010036965: –70 °C

Condición: –70 °C, erguido Fecha de inicio: 9 Sep 2009		Meses		
Método	Parámetro	0	12	24
Aspecto	Color	CL	de CL a SY	de CL a SY
	Partículas	Ninguno	Ninguno	Ninguno
pH	pH	6,72	6,70	6,72
CE–SDS, reducido	% Pico Principal	98,972	98,905	98,404
	% LMW	1,028	1,095	1,096
	% HMW	0,0	0,0	0,498
SE–HPLC	% Pico Principal	98,795	98,843	98,815
	% HMW	1,205	1,156	1,184
	% LMW	0,0	0,0	0,0
cIEF	% Pico Principal	68,445	72,046	70,181
	% ácido	16,282	15,191	16,026
	% básico	15,273	12,762	13,791
Bioensayo	% de Potencia Relativa	100	100	100
Partículas subvisibles	≥ 10 µm por contenedor	< 10	< 10	< 10
	≥ 25 µm por contenedor	< 10	< 10	< 10

CL = incoloro; SY = amarillento; HMW = elevado peso molecular; LMW = Bajo peso molecular

Tabla 20: Síntesis de datos de estabilidad de la inyección de STM 434, Lote 0010036965: -20 °C

Condición: -20 °C, Erguido Fecha de inicio: 9 Sep 2009		Meses								
Método	Parámetro	0	1	3	6	9	12	18	24	30
Aspecto	Color	CL	de CL a SY	de CL a SY	de CL a SY	de CL a SY	de CL a SY	de CL a SY	de CL a SY	de CL SY
	Partículas	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno
pH	pH	6,72	6,69	6,70	6,67	6,64	6,73	6,72	6,70	6,68
CE-SDS, reducido	% Pico Principal	98,972	98,761	98,889	98,964	99,094	98,919	98,968	99,002	98,903
	% LMW	1,028	1,239	1,111	1,036	0,906	1,081	1,031	0,997	1,096
	% HMW	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SE-HPLC	% Pico Principal	98,795	98,777	98,787	98,770	98,744	98,775	98,734	98,742	98,607
	% HMW	1,205	1,223	1,213	1,230	1,255	1,224	1,265	1,254	1,392
	% LMW	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
cIEF	% Pico Principal	68,445	68,390	68,516	67,255	71,142	69,844	68,774	70,214	69,094
	% ácido	16,282	17,454	16,285	17,599	16,522	14,354	17,089	15,963	16,242
	% básico	15,273	14,156	15,199	15,146	12,337	15,800	14,135	13,822	14,663
Bioensayo	% de Potencia Relativa	100	100	102	95	103	102	102	99	102
Partículas subvisibles	≥ 10 µm por contenedor	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	≥ 25 µm por contenedor	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Esterilidad	Esterilidad	Pass	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	Pass	N.S.	Pass	N.S.

CL = Incoloro; SY = amarillento; HMW = elevado peso molecular; LMW = bajo peso molecular; N.S. = no se programó (no se programó)

Tabla 21: Síntesis de datos de estabilidad de la inyección de STM 434, Lote 0010036965: 5× congelación/descongelación

Condición: 5× F/T			
Fecha de inicio: 9 Sep 2009		Condición	
Método	Parámetro	T = 0	5× F/T
Aspecto	Color	CL	de CL a SY
	Partículas	Ninguno	Ninguno
pH	pH	6,72	6,68
CE–SDS, reducido	% Pico Principal	98,972	98,544
	% LMW	1,028	1,455
	% HMW	0,0	0,0
SE–HPLC	% Pico Principal	98,795	98,787
	% HMW	1,205	1,213
	% LMW	0,0	0,0
cIEF	% Pico Principal	68,445	68,255
	% ácido	16,282	18,293
	% básico	15,273	13,452
Bioensayo	% de Potencia Relativa	100	100
Partículas subvisibles	≥ 10 µm por contenedor	< 10	< 10
	≥ 25 µm por contenedor	< 10	< 10

CL = incoloro; SY = amarillento; HMW = elevado peso molecular; LMW = bajo peso molecular

Tabla 22: Síntesis de datos de estabilidad de la inyección de STM 434, Lote 0010036965: 5 °C

Condición: 5 °C, Erguido Fecha de inicio: 9 Sep 2009		Meses				
Método	Parámetro	0	0,5	1	3	6
Aspecto	Color	CL	de CL a SY	de CL a SY	de CL a SY	de CL a SY
	Partículas	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno
pH	pH	6,72	6,70	6,69	6,71	6,67
CE–SDS, reducido	% Pico Principal	98,972	98,856	98,313	98,945	99,048
	% LMW	1,028	1,144	1,687	1,055	0,952
	% HMW	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SE–HPLC	% Pico Principal	98,795	98,831	98,793	98,824	98,792
	% HMW	1,205	1,169	1,207	1,176	1,208
	% LMW	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
cIEF	% Pico Principal	68,445	67,703	67,012	67,239	69,441
	% ácido	16,282	16,196	18,094	17,907	15,290
	% básico	15,273	16,101	14,894	14,855	15,269
Bioensayo	% de Potencia Relativa	100	99	100	104	94
Partículas subvisibles	≥ 10 µm por contenedor	< 10	11	< 10	< 10	< 10
	≥ 25 µm por contenedor	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

CL = incoloro; SY = amarillento HMW = elevado peso molecular; LMW = bajo peso molecular; N.S. = no se programó

Tabla 23: Síntesis de datos de estabilidad de la inyección de STM 434, Lote 0010036965: 25 °C

Condición: 25 °C, Erguido Fecha de inicio: 9 Sep 2009		Meses	
Método	Parámetro	0	0,25
Aspecto	Color	CL	de CL a SY
	Partículas	Ninguno	Ninguno
pH	pH	6,72	6,71
CE–SDS, reducido	% Pico Principal	98,972	98,851
	% LMW	1,028	1,150
	% HMW	0,0	0,0
SE–HPLC	% Pico Principal	98,795	98,901
	% HMW	1,205	1,099
	% LMW	0,0	0,0
cIEF	% Pico Principal	68,445	68,002
	% ácido	16,282	16,670
	% básico	15,273	15,328
Bioensayo	% de Potencia Relativa	100	97
Partículas subvisibles	≥ 10 µm por contenedor	< 10	< 10
	≥ 25 µm por contenedor	< 10	< 10

CL = incoloro; SY = amarillento; HMW = elevado peso molecular; LMW = bajo peso molecular; N.S. = no se programó

Tabla 24: síntesis de datos de estabilidad de la inyección de STM 434, Lote EG-13-0150: -20 °C (SPN-643)

Condición: -20 °C, Erguido Fecha de inicio: 17 Dic 2013			Meses					
Método	Parámetro	Criterios de aceptabilidad	0	1	3	6	9	12
Aspecto	Claridad	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L
	Color	de CL a LY	LY	CL	CL	CL	CL	CL
	Partículas	EFOP	EFOP	NVP	NVP	NVP	NVP	NVP
pH	pH	6,4-7,0	6,7	6,7	6,6	6,7	6,6	6,6
Concentración según UV	mg/mL	63-77	71,8	68,9	69,6	69,5	68,9	69,2
CE-SDS, reducido	% Pico Principal	≥ 90,0%	98,7	98,8	99,2	99,4 99,3 99,2*	99,1	99,2
CE-SDS, No-Reducido	% Pico Principal	≥ 88,0%	93,8	93,7	92,7	94,0	93,8	94,0
	% Prepico	—	6,2	6,3	6,7	6,0	6,2	6,0
	% otros	—	N.D.	N.D.	0,6	N.D.	N.D.	0,0
SE-HPLC	% Pico Principal	≥ 95,0%	98,7	98,7	98,7	98,7	98,6	98,6
	% HMW	—	1,3	1,3	1,3	1,3	1,4	1,4
	% LMW	—	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	0,0
icIEF	% Pico Principal	65,0±10,0	64,8	67,1	61,6	65,1	64,7	66,8
	% APG	—	21,5	22,0	18,5	21,6	19,0	17,9
	% BPG	—	13,9	10,9	20,0	13,3	16,3	15,4
Bioensayo	% de Potencia Relativa	60-140	99	93,2	94,4	110	99,3	105,0
Partículas subvisibles	≥ 10 µm	≤ 6.000 por contenedor	2	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	10
	≥ 25 µm	≤ 600 por contenedor	0	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0
Integridad del cierre del contenedor	Ingreso de tintes	No se detectó ingreso de tintes	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	NDDI

CLR L = líquido límpido; CL = incoloro; LY = amarillento; EFOP = esencialmente libre de partículas (essentially free of particles); NVP = no hay partículas visibles (no visible particles); HMW = elevado peso molecular; LMW = bajo peso molecular; APG = grupo pico ácido (acidic peak group); BPG = grupo pico básico (basic peak group); N.D. = no se detectó (not detected); N.S. = no se programó; NDDI = no se detectó el ingreso de tintes.

*se consignaron tres valores debido a una desviación (el analista ejecutó tres inyecciones, el método requiere una sola)

Tabla 25: síntesis de datos de estabilidad de la inyección de STM 434, Lote EG-13-0150: 2-8 °C (SPN-644)

Condición: 2-8 °C, Erguido Fecha de inicio: 17 Dic 2013			Meses					
Método	Parámetro	Criterios de aceptabilidad	0	1	3	6	9	12
Aspecto	Claridad	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L
	Color	de CL a LY	LY	CL	CL	CL	CL	CL
	Partículas	EFOP	EFOP	NVP	NVP	NVP	NVP	NVP
pH	pH	6,4-7,0	6,7	6,7	6,6	6,7	6,6	6,6
Concentración según UV	mg/mL	63-77	71,8	68,9	68,7	69,3	68,5	69,9
CE-SDS, reducido	% Pico Principal	≥ 90,0%	98,7	98,8	99,1	99,1 99,1 98,9*	99,0	99,1
CE-SDS, No-Reducido	% Pico Principal	≥ 88,0%	93,8	93,7	93,0	94,0	94,3	93,6
	% Prepico	—	6,2	6,3	6,8	6,0	5,7	6,4
	% de otros	—	N.D.	N.D.	0,2	N.D.	N.D.	0,0
SE-HPLC	% Pico Principal	≥ 95,0%	98,7	98,7	98,7	98,6	98,6	98,5
	% HMW	—	1,3	1,3	1,3	1,4	1,4	1,4
	% LMW	—	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	0,1
icIEF	% Pico Principal	65,0±10,0	64,8	67,1	57,7	64,4	65,2	66,9
	% APG	—	21,5	22,0	18,5	23,0	19,6	19,3
	% BPG	—	13,9	10,9	23,8	12,7	15,2	13,9
Bioensayo	% de Potencia Relativa	60-140	99	93,2	99,7	114	102,6	106,5
Partículas subvisibles	≥ 10 µm	≤ 6.000 por contenedor	2	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	236
	≥ 25 µm	≤ 600 por contenedor	0	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	5
Integridad del cierre del contenedor	Ingreso de tintes	No Se detectó el ingreso de tintes	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	NDDI

CLR L = líquido límpido; CL = incoloro; LY = amarillento; EFOP = esencialmente libre de partículas; NVP = Partículas no visibles; HMW = elevado peso molecular; LMW = bajo peso molecular; APG = grupo pico ácido; BPG = grupo pico básico; N.D. = no se detectó; N.S. = no se programó; NDDI = no se detectó ingreso de tintes.

*Se consignaron tres valores debido a una desviación (el analista ejecutó tres inyecciones, el método requiere una sola)

Tabla 26: Síntesis de datos de estabilidad de la inyección de STM 434, Lote EG–13–0150: 25 °C

Condición: 25 °C, Erguido Fecha de inicio: 17 Dic 2013			Meses	
Método	Parámetro	Criterios de aceptabilidad	0	1
Aspecto	Claridad	CLR L	CLR L	CLR L
	Color	de CL a LY	LY	CL
	Partículas	EFOP	EFOP	NVP
pH	pH	6,4–7,0	6,7	6,6
Concentración según UV	mg/mL	63–77	71,8	69,4
CE–SDS, reducido	% Pico Principal	≥ 90,0%	98,7	98,7
CE–SDS, no reducido	% Pico Principal	≥ 88,0%	93,8	94,0
	% Prepico	—	6,2	6,0
SE–HPLC	% Pico Principal	≥ 95,0%	98,7	98,5
	% HMW	—	1,3	1,3
	% LMW	—	≤ 0,5	≤ 0,5
icIEF	% Pico Principal	65,0±10,0	64,8	66,7
	% APG	—	21,5	22,3
	% BPG	—	13,9	11,1
Bioensayo	% de Potencia Relativa	60–140	99	86,9

CLR L = líquido límpido; CL = incoloro; LY = amarillento; EFOP = esencialmente libre de partículas; NVP = no hay partículas visibles; HMW = elevado peso molecular; LMW = bajo peso molecular; APG = grupo pico ácido; BPG = grupo pico básico; N.D. = no se detectó

Tabla 27: Síntesis de datos de estabilidad de la inyección de STM 434, Lote EG-13-0150: 5× congelación/descongelación

Condición: 5× congelación/descongelación Fecha de inicio: 13 Feb 2014				
Método	Parámetro	Criterios de aceptabilidad	T = 0	5× F/T
Aspecto	Claridad	CLR L	CLR L	CLR L
	Color	de CL a LY	LY	CL
	Partículas	EFOP	EFOP	NVP
pH	pH	6,4–7,0	6,7	6,7
Concentración según UV	mg/mL	63–77	71,8	70,5
CE–SDS, reducido	% Pico Principal	≥ 90,0%	98,7	98,9
CE–SDS, no reducido	% Pico Principal	≥ 88,0%	93,8	94,4
	% Prepico	—	6,2	5,6
SE–HPLC	% Pico Principal	≥ 95,0%	98,7	98,8
	% HMW	—	1,3	1,2
	% LMW	—	≤ 0,5	≤ 0,5
icIEF	% Pico Principal	65,0±10,0	64,8	69,4
	% APG	—	21,5	17,0
	% BPG	—	13,9	13,7
Bioensayo	% de Potencia Relativa	60–140	99	96

CLR L = líquido límpido; CL = incoloro; LY = amarillento; EFOP = esencialmente libre de partículas; NVP = no hay partículas visibles; HMW = elevado peso molecular; LMW = bajo peso molecular; APG = grupo ácido pico; BPG = grupo pico básico; N.D. = no se detectó.

Tabla 28: Síntesis de datos de estabilidad de la inyección de STM 434, Lote FG-13-0230: -70 °C (SPN-657)

Condición: -70 °C, Erguido Fecha de inicio: 31 Enero de 2014			Meses		
Método	Parámetro	Criterios de aceptabilidad	0	1	3
Aspecto	Claridad	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L
	Color	de CL a LY	LY	CL	CL
	Partículas	EFOP	EFOP	NVP	NVP
pH	pH	6,4-7,0	6,7	6,5	6,5
Concentración según UV	mg/mL	63-77	67,7	67,5	68,4
CE-SDS, reducido	% Pico Principal	≥ 90,0%	98,7	99,0	98,9
CE-SDS, no reducido	% Pico Principal	≥ 88,0%	94,4	94,6	94,4
	% Prepico	—	5,6	5,4	5,6
SE-HPLC	% Pico Principal	≥ 95,0%	98,9	98,9	98,8
	% HMW	—	1,1	1,1	1,2
	% LMW	—	N.D.	≤ 0,5	≤ 0,5
icIEF	% Pico Principal	65,0±10,0	68,7	70,4	71,3
	% APG	—	17,5	17,8	17,9
	% BPG	—	13,9	11,9	11,0
Bioensayo	% de Potencia	60-140	99	115	107
	Relativa				
Partículas subvisibles	≥ 10 µm	≤ 6.000 por contenedor	2	N.S.	N.S.
	≥ 25 µm	≤ 600 por contenedor	0	N.S.	N.S.
Integridad del cierre del contenedor	Ingreso de tintes	No se detectó ingreso de tintes	N.S.	N.S.	N.S.

CLR L = líquido límpido; CL = incoloro; LY = amarillento; EFOP = esencialmente libre de partículas; NVP = no hay partículas visibles; HMW = elevado peso molecular; LMW = bajo peso molecular; APG = grupo pico ácido; BPG = grupo pico básico; N.D. = no se detectó; N.S. = no se programó.

Tabla 29: Síntesis de datos de estabilidad de la inyección de STM 434, Lote FG-13-0230: -20 °C (SPN-648)

Condición: -20 °C, Erguido Fecha de inicio: 31 enero de 2014			Meses					
Método	Parámetro	Criterios de aceptabilidad	0	1	3	6	9	12
Aspecto	Claridad	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L
	Color	de CL a LY	LY	CL	CL	CL	CL	CL
	Partículas	EFOP	EFOP	NVP	NVP	NVP	NVP	NVP
pH	pH	6,4-7,0	6,7	6,5	6,5	6,5	6,5	6,4
Concentración según UV	mg/mL	63-77	67,7	66,8	68,4	67,5	69,2	70,9
CE-SDS, reducido	% Pico Principal	≥ 90,0%	98,7	99,1	99,1	99,2	99,2	99,5
CE-SDS, no reducido	% Pico Principal	≥ 88,0%	94,4	93,9	94,0	93,2	93,8	94,1
	% Prepico	—	5,6	6,1	6,0	6,8	6,2	5,9
SE-HPLC	% Pico Principal	≥ 95,0%	98,9	98,9	98,8	98,6	98,8	98,8
	% HMW	—	1,1	1,1	1,2	1,2	1,2	1,2
	% LMW	—	N.D.	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	0,0
icIEF	% Pico Principal	65,0±10,0	68,7	67,7	69,6	66,0	64,7	70,2
	% APG	—	17,5	19,0	19,2	19,3	16,6	17,7
	% BPG	—	13,9	13,4	11,3	14,8	18,8	12,1
Bioensayo	% de Potencia	60-140	99	100	115	96	94	106
	Relativa							
Partículas subvisibles	≥ 10 µm	≤ 6.000 por contenedor	2	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
	≥ 25 µm	≤ 600 por contenedor	0	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Integridad del cierre del contenedor	Ingreso de tintes	No se detectó ingreso de tintes	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

CLR L = líquido límpido; CL = incoloro; LY = amarillento; EFOP = esencialmente libre de partículas; NVP = no hay partículas visibles; HMW = elevado peso molecular; LMW = bajo peso molecular; APG = grupo pico ácido; BPG = grupo pico básico; N.D. = no se detectó; N.S. = no se programó.

Tabla 30: Síntesis de datos de estabilidad de la inyección de STM 434, Lote FG-13-0230: 2-8 °C (SPN-649)

Condición: 2-8 °C, Erguido Fecha de inicio: 31 enero de 2014			Meses					
Método	Parámetro	Criterios de aceptabilidad	0	1	3	6	9	12
Aspecto	Claridad	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L
	Color	de CL a LY	LY	CL	CL	CL	CL	CL
	Partículas	EFOP	EFOP	NVP	NVP	NVP	NVP	NVP
pH	pH	6,4-7,0	6,7	6,5	6,5	6,5	6,4	6,5
Concentración según UV	mg/mL	63-77	67,7	68,1	68,3	67,5	68,1	72,5
CE-SDS, reducido	% Pico Principal	≥ 90,0%	98,7	99,1	99,1	99,2	99,2	99,5
CE-SDS, no reducido	% Pico Principal	≥ 88,0%	94,4	94,4	94,3	93,8	95,1	93,6
	% Prepico	—	5,6	5,6	5,7	6,2	4,9	6,4
SE-HPLC	% Pico Principal	≥ 95,0%	98,9	98,9	98,8	98,8	98,8	98,8
	% HMW	—	1,1	1,1	1,1	1,2	1,2	1,2
	% LMW	—	N.D.	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	0,0
icIEF	% Pico Principal	65,0±10,0	68,7	68,5	68,8	65,3	64,2	67,5
	% APG	—	17,5	18,9	19,5	21,2	17,8	18,0
	% BPG	—	13,9	12,6	11,7	13,6	18,2	14,5
Bioensayo	% de Potencia Relativa	60-140	99	116	108	93	116	121
Partículas subvisibles	≥ 10 µm	≤ 6.000 por contenedor	2	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
	≥ 25 µm	≤ 600 por contenedor	0	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Integridad del cierre del contenedor	Ingreso de tintes	No se detectó ingreso de tintes	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

CLR L = líquido límpido; CL = incoloro; LY = amarillento; EFOP = esencialmente libre de partículas; NVP = no hay partículas visibles; HMW = elevado peso molecular; LMW = bajo peso molecular; APG = grupo pico ácido; BPG = grupo pico básico; N.D. = no se detectó; N.S. = no se programó.

Tabla 31: Síntesis de datos de estabilidad de la inyección de STM 434, Lote FG-13-0230: 25 °C (SPN-650)

Condición: 25 °C, Erguido Fecha de inicio: 31 de enero de 2014			Meses	
Método	Parámetro	Criterios de aceptabilidad	0	1
Aspecto	Claridad	CLR L	CLR L	CLR L
	Color	de CL a LY	LY	CL
	Partículas	EFOP	EFOP	NVP
pH	pH	6,4–7,0	6,7	6,5
Concentración según UV	mg/mL	63–77	67,7	67,3
CE–SDS, reducido	% Pico Principal	≥ 90,0%	98,7	99,0
CE–SDS, no reducido	% Pico Principal	≥ 88,0%	94,4	94,4
	% Prepico	—	5,6	5,6
SE–HPLC	% Pico Principal	≥ 95,0%	98,9	98,9
	% HMW	—	1,1	1,1
	% LMW	—	N.D.	≤ 0,5
icIEF	% Pico Principal	65,0±10,0	68,7	68,6
	% APG	—	17,5	19,8
	% BPG	—	13,9	11,7
Bioensayo	% de Potencia Relativa	60–140	99	116
Partículas subvisibles	≥ 10 µm	≤ 6.000 por contenedor	2	10
	≥ 25 µm	≤ 600 por contenedor	0	3
Integridad del cierre del contenedor	Ingreso de tintes	No se detectó ingreso de tintes	N.S.	No se detectó ingreso de tintes

CLR L = líquido límpido; CL = incoloro; LY = amarillento; EFOP = esencialmente libre de partículas; NVP = no hay partículas visibles; HMW = elevado peso molecular; LMW = bajo peso molecular; APG = grupo pico ácido; BPG = grupo pico básico; N.D. = no se detectó; N.S. = no se programó

Tabla 32: Síntesis de datos de estabilidad de la inyección de STM 434, Lote FG-14-0056: -20 °C (SPN-654)

Condición: 2-8 °C, Erguido Fecha de inicio: 20 Feb 2014			Meses	
Método	Parámetro	Criterios de aceptabilidad	0	1
Aspecto	Claridad	CLR L	CLR L	CLR L
	Color	de CL a LY	LY	CL
	Partículas	EFOP	EFOP	NVP
pH	pH	6,4-7,0	6,7	6,5
Concentración según UV	mg/mL	63-77	67,7	68,2
CE-SDS, reducido	% Pico Principal	≥ 90,0%	98,7	98,9
CE-SDS, no reducido	% Pico Principal	≥ 88,0%	94,4	93,8
	% Prepico	—	5,6	5,2
SE-HPLC	% Pico Principal	≥ 95,0%	98,9	98,7
	% HMW	—	1,1	1,3
	% LMW	—	N.D.	≤ 0,5
icIEF	% Pico Principal	65,0±10,0	68,7	70,9
	% APG	—	17,5	17,6
	% BPG	—	13,9	11,6
Bioensayo	% de Potencia	60-140	99	117
	Relativa			
Partículas subvisibles	≥ 10 µm	≤ 6.000 por contenedor	2	N.S.
	≥ 25 µm	≤ 600 por contenedor	0	N.S.
Integridad del cierre del contenedor	Ingreso de tintes	No se detectó ingreso de tintes	N.S.	N.S.

CLR L = líquido límpido; CL = incoloro; LY = amarillento; EFOP = esencialmente libre de partículas; NVP = no hay partículas visibles; HMW = elevado peso molecular; LMW = bajo peso molecular; APG = grupo pico ácido; BPG = grupo pico básico; N.D. = no se detectó; N.S. = no se programó.

Tabla 33: Síntesis de datos de estabilidad de la inyección de STM 434, Lote FG-14-0056: 2-8 °C (SPN-655)

Condición: 2-8 °C, Erguido Fecha de inicio: 20 Feb 2014			Meses	
Método	Parámetro	Criterios de aceptabilidad	0	1
Aspecto	Claridad	CLR L	CLR L	CLR L
	Color	de CL a LY	LY	CL
	Partículas	EFOP	EFOP	NVP
pH	pH	6,4-7,0	6,7	6,5
Concentración según UV	mg/mL	63-77	67,7	68,4
CE-SDS, reducido	% Pico Principal	≥ 90,0%	98,7	98,8
CE-SDS, no reducido	% Pico Principal	≥ 88,0%	94,4	93,4
	% Prepico	—	5,6	6,6
SE-HPLC	% Pico Principal	≥ 95,0%	98,9	98,8
	% HMW	—	1,1	1,2
	% LMW	—	N.D.	≤ 0,5
icIEF	% Pico Principal	65,0±10,0	68,7	67,6
	% APG	—	17,5	19,2
	% BPG	—	13,9	13,3
Bioensayo	% de Potencia	60-140	99	102
	Relativa			
Partículas subvisibles	≥ 10 µm	≤ 6.000 por contenedor	2	N.S.
	≥ 25 µm	≤ 600 por contenedor	0	N.S.
Integridad del cierre del contenedor	Ingreso de tintes	No se detectó ingreso de tintes	N.S.	N.S.

CLR L = líquido límpido; CL = incoloro; LY = amarillento; EFOP = esencialmente libre de partículas; NVP = no hay partículas visibles; HMW = elevado peso molecular; LMW = bajo peso molecular; APG = grupo pico ácido; BPG = grupo pico básico; N.D. = no se detectó; N.S. = no se programó

Tabla 34: Síntesis de datos de estabilidad de la inyección de STM 434, Lote FG-14-0056: 25 °C (SPN-656)

Condición: 25 °C, Erguido Fecha de inicio: 20 Feb 2014			Meses	
Método	Parámetro	Criterios de aceptabilidad	0	1
Aspecto	Claridad	CLR L	CLR L	CLR L
	Color	de CL a LY	LY	CL
	Partículas	EFOP	EFOP	NVP
pH	pH	6,4–7,0	6,7	6,5
Concentración según UV	mg/mL	63–77	67,7	68,5
CE–SDS, reducido	% Pico Principal	≥ 90,0%	98,7	98,7
CE–SDS, no reducido	% Pico Principal	≥ 88,0%	94,4	93,7
	% Prepico	—	5,6	6,3
SE–HPLC	% Pico Principal	≥ 95,0%	98,9	98,5
	% HMW	—	1,1	1,3
	% LMW	—	N.D.	0,3
icIEF	% Pico Principal	65,0±10,0	68,7	70,8
	% APG	—	17,5	17,1
	% BPG	—	13,9	12,2
Bioensayo	% de Potencia	60–140	99	122
	Relativa			
Partículas subvisibles	≥ 10 µm	≤ 6.000 por contenedor	2	N.S.
	≥ 25 µm	≤ 600 por contenedor	0	N.S.
Integridad del cierre del contenedor	Ingreso de tintes	No se detectó ingreso de tintes	N.S.	N.S.

CLR L = líquido límpido; CL = incoloro; LY = amarillento; EFOP = esencialmente libre de partículas; NVP = no hay partículas visibles; HMW = elevado peso molecular; LMW = bajo peso molecular; APG = grupo pico ácido; BPG = grupo pico básico; N.D. = no se detectó; N.S. = no se programó.

Tabla 35: Síntesis de datos de estabilidad de la inyección de STM 434, Lote FG-14-0109: -20 °C Erguido (SPN-676)

Condición: -20 °C, Erguido Fecha de inicio: 25 Jun 2014			Meses		
Método	Parámetro	Criterios de aceptabilidad	0	3	6
Aspecto	Claridad	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L
	Color	de CL a LY	CL	CL	CL
	Partículas	EFOP	FOP	NVP	NVP
pH	pH	6,4-7,0	6,6	6,5	6,5
Concentración según UV	mg/mL	63-77	67,8	67,5	67,2
CE-SDS, reducido	% Pico Principal	≥ 90,0%	98,5	98,6	99,2
CE-SDS, no reducido	% Pico Principal	≥ 88,0%	94,4	94,2	93,8
	% Prepico	—	5,6	5,8	6,4
SE-HPLC	% Pico Principal	≥ 95,0%	98,8	98,9	98,8
	% HMW	—	1,2	1,1	1,2
	% LMW	—	N.D.	≤ 0,5	0,0
icIEF	% Pico Principal	65,0±10,0	65,4	65,7	69,1
	% APG	—	23,0	18,7	17,9
	% BPG	—	11,6	15,6	13,1
Bioensayo	% de Potencia Relativa	60-140	98	96	101
Partículas subvisibles	≥ 10 µm	≤ 6.000 por contenedor	2	N.S.	N.S.
	≥ 25 µm	≤ 600 por contenedor	0	N.S.	N.S.
Integridad del cierre del contenedor	Ingreso de tintes	No se detectó ingreso de tintes	N.S.	N.S.	N.S.

CLR L = líquido límpido; CL = incoloro; LY = amarillento; EFOP = esencialmente libre de partículas; NVP = no hay partículas visibles; HMW = elevado peso molecular; LMW = bajo peso molecular; APG = grupo pico ácido; BPG = grupo pico básico; N.D. = no se detectó; N.S. = no se programó.

Tabla 36: Síntesis de datos de estabilidad de la inyección de STM 434, Lote FG—14-0109: 2–8 °C Erguido (SPN-677)

Condición: 2–8 °C, Erguido Fecha de inicio: 25 Jun 2014			Meses		
Método	Parámetro	Criterios de aceptabilidad	0	3	6
Aspecto	Claridad	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L
	Color	de CL a LY	CL	CL	CL
	Partículas	EFOP	FOP	NVP	NVP
pH	pH	6,4–7,0	6,6	6,5	6,5
Concentración según UV	mg/mL	63–77	67,8	67,3	67,5
CE–SDS, reducido	% Pico Principal	≥ 90,0%	98,5	98,7	99,0
CE–SDS, no reducido	% Pico Principal	≥ 88,0%	94,4	94,1	94,0
	% Prepico	—	5,6	5,9	6,0
SE–HPLC	% Pico Principal	≥ 95,0%	98,8	98,9	98,8
	% HMW	—	1,2	1,1	1,2
	% LMW	—	N.D.	≤ 0,5	0,1
icIEF	% Pico Principal	65,0±10,0	65,4	65,7	67,3
	% APG	—	23,0	18,9	19,2
	% BPG	—	11,6	15,5	13,8
Bioensayo	% de Potencia	60–140	98	92	107
	Relativa				
Partículas subvisibles	≥ 10 µm	≤ 6.000 por contenedor	2	N.S.	N.S.
	≥ 25 µm	≤ 600 por contenedor	0	N.S.	N.S.
Integridad del cierre del contenedor	Ingreso de tintes	No se detectó ingreso de tintes	N.S.	N.S.	N.S.

CLR L = líquido límpido; CL = incoloro; LY = amarillento; EFOP = esencialmente libre de partículas; NVP = no hay partículas visibles; HMW = elevado peso molecular; LMW = bajo peso molecular; APG = grupo pico ácido; BPG = grupo pico básico; N.D. = no se detectó; N.S. = no se programó.

Tabla 37: Síntesis de datos de estabilidad de la inyección de STM 434, Lote FG—14-0109: 2–8 °C Invertido (SPN–678)

Condición: 2–8 °C, Invertido Fecha de inicio: 25 Jun 2014			Meses		
Método	Parámetro	Criterios de aceptabilidad	0	3	6
Aspecto	Claridad	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L
	Color	de CL a LY	CL	CL	CL
	Partículas	EFOP	FOP	NVP	NVP
pH	pH	6,4–7,0	6,6	6,5	6,5
Concentración según UV	mg/mL	63–77	67,8	67,7	67,7
CE–SDS, reducido	% Pico Principal	≥ 90,0%	98,5	98,8	99,1
CE–SDS, no reducido	% Pico Principal	≥ 88,0%	94,4	94,3	94,0
	% Prepico	—	5,6	5,7	6,0
SE–HPLC	% Pico Principal	≥ 95,0%	98,8	98,9	98,8
	% HMW	—	1,2	1,1	1,2
	% LMW	—	N.D.	≤ 0,5	0,1
icIEF	% Pico Principal	65,0±10,0	65,4	65,5	68,5
	% APG	—	23,0	19,5	18,9
	% BPG	—	11,6	15,1	12,8
Bioensayo	% de Potencia	60–140	98	96	112
	Relativa				
Partículas subvisibles	≥ 10 µm	≤ 6.000 por contenedor	2	N.S.	N.S.
	≥ 25 µm	≤ 600 por contenedor	0	N.S.	N.S.
Integridad del cierre del contenedor	Ingreso de tintes	No se detectó ingreso de tintes	N.S.	N.S.	N.S.

CLR L = líquido límpido; CL = incoloro; LY = amarillento; EFOP = esencialmente libre de partículas; NVP = no hay partículas visibles; HMW = elevado peso molecular; LMW = bajo peso molecular; APG = grupo pico ácido; BPG = grupo pico básico; N.D. = no se detectó; N.S. = no se programó.

Tabla 38: Síntesis de datos de estabilidad de la inyección de STM 434, Lote FG-14-0109: 25 °C Erguido (SPN-679)

Condición: 25 °C, Erguido Fecha de inicio: 25 Jun 2014			Meses		
Método	Parámetro	Criterios de aceptabilidad	0	3	6
Aspecto	Claridad	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L
	Color	de CL a LY	CL	CL	CL
	Partículas	EFOP	FOP	NVP	NVP
pH	pH	6,4–7,0	6,6	6,5	6,5
Concentración según UV	mg/mL	63–77	67,8	68,3	67,7
CE–SDS, reducido	% Pico Principal	≥ 90,0%	98,5	98,7	98,8
CE–SDS, no reducido	% Pico Principal	≥ 88,0%	94,4	94,3	93,6
	% Prepico	—	5,6	5,7	6,4
SE–HPLC	% Pico Principal	≥ 95,0%	98,8	98,5	98,3
	% HMW	—	1,2	1,2	1,4
	% LMW	—	N.D.	≤ 0,5	0,3
icIEF	% Pico Principal	65,0±10,0	65,4	61,5	62,5
	% APG	—	23,0	22,6	25,1
	% BPG	—	11,6	16,0	12,5
Bioensayo	% de Potencia Relativa	60–140	98	91	105
Partículas subvisibles	≥ 10 µm	≤ 6.000 por contenedor	2	N.S.	36
	≥ 25 µm	≤ 600 por contenedor	0	N.S.	2
Integridad del cierre del contenedor	Ingreso de tintes	No se detectó ingreso de tintes	N.S.	N.S.	NDDI

CLR L = líquido límpido; CL = incoloro; LY = amarillento; EFOP = esencialmente libre de partículas; NVP = no hay partículas visibles; HMW = elevado peso molecular; LMW = bajo peso molecular; APG = grupo pico ácido; BPG = grupo pico básico; N.D. = no se detectó; N.S. = no se programó; NDDI = no se detectó ingreso de tintes.

Tabla 39: Síntesis de datos de estabilidad de la inyección de STM 434, Lote FG-14-0109: 25 °C Invertido (SPN-680)

Condición: 25 °C, Invertido Fecha de inicio: 25 Jun 2014			Meses		
Método	Parámetro	Criterios de aceptabilidad	0	3	6
Aspecto	Claridad	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L
	Color	de CL a LY	CL	CL	CL
	Partículas	EFOP	FOP	NVP	NVP
pH	pH	6,4–7,0	6,6	6,5	6,5
Concentración según UV	mg/mL	63–77	67,8	67,7	67,2
CE–SDS, reducido	% Pico Principal	≥ 90,0%	98,5	98,7	98,6
CE–SDS, no reducido	% Pico Principal	≥ 88,0%	94,4	94,2	93,9
	% Prepico	—	5,6	5,8	6,1
SE–HPLC	% Pico Principal	≥ 95,0%	98,8	98,5	98,3
	% HMW	—	1,2	1,2	1,4
	% LMW	—	N.D.	≤ 0,5	0,3
icIEF	% Pico Principal	65,0±10,0	65,4	62,3	61,5
	% APG	—	23,0	22,5	26,8
	% BPG	—	11,6	15,4	11,8
Bioensayo	% de Potencia Relativa	60–140	98	94	98
Partículas subvisibles	≥ 10 µm	≤ 6.000 por contenedor	2	N.S.	7
	≥ 25 µm	≤ 600 por contenedor	0	N.S.	2
Integridad del cierre del contenedor	Ingreso de tintes	No se detectó ingreso de tintes	N.S.	N.S.	NDDI

CLR L = líquido límpido; CL = incoloro; LY = amarillento; EFOP = esencialmente libre de partículas; NVP = no hay partículas visibles; HMW = elevado peso molecular; LMW = bajo peso molecular; APG = grupo pico ácido; BPG = grupo pico básico; N.D. = no se detectó; N.S. = no se programó; NDDI = no se detectó ingreso de tintes.

Ejemplo 8: La administración de STM 434 altera la composición del cuerpo humano.

[00388] Se eligió un sujeto humano para su tratamiento con STM 434, para lo cual se utilizó el protocolo anterior explicado en el Ejemplo 4. El sujeto era un varón afronorteamericano de 62 años de edad con carcinoma de células renales papilares recurrente metastásicos de nódulos linfáticos de riñón y pelvis. Había recibido ocho líneas anteriores de terapia antitumoral con Torisel, Pazopanib, y agentes objeto de investigación que incluían B7–H3 mAb, inhibidores de cMet, inhibidor de CHK1, un inhibidor de Aurora quinasa, e Interleuquina 10 humana recombinante.

[00389] Formulación, envasado y almacenamiento de STM 434

[00390] Se formuló el STM 434 como una composición acuosa estéril destinada para administración IV, que contenía 70 mg/mL de STM 434, 10 mM de tampón fosfato de potasio, 8,8% (peso/volumen) de sacarosa, y 0,006% (peso/volumen) de polisorbato 20 a pH 6,7. La solución de STM 434 formulada fue envasada en frascos de vidrio de 5 ml, con tapones de fluorpolímero de 13 mm y sellos de 13 mm. Los frascos de STM 434 fueron almacenados en un congelador libre non–frost a una temperatura de –20 °C (± 5 °C). Antes de su utilización, el STM 434 fue descongelado durante la noche en un refrigerador a una temperatura de 2 °C a 8 °C.

[00391] Administración y Supervisión del STM 434

[00392] El STM 434 fue administrado al sujeto a razón de 0,25 mg/kg IV aproximadamente cada 4 semanas (Cohorte 2).

[00393] El primero escaneo de DXA fue llevado a cabo el 30 diciembre de 2014; la dosificación tuvo lugar el 6 enero de 2015, 3 de febrero de 2015, y el 3 de marzo de 2015; el escaneo de DXA de seguimiento tuvo lugar el 31 marzo de 2015.

[00394] Cambios con respecto a la línea de base en la masa corporal magra, masa apendicular magra, y masa grasa (visceral y subcutánea)

[00395] Se llevaron a cabo varias mediciones de la composición corporal con una separación entre sí de aproximadamente tres meses para evaluar el impacto del STM 434 sobre la composición del cuerpo, por ejemplo, músculos y grasas. La masa corporal magra, la masa apendicular magra, y la masa grasa, y distribución de la grasa (visceral y subcutánea) fueron determinadas mediante escaneo DXA. Los escaneos DXA fueron analizados por el radiólogo in situ confirmados por el laboratorio de radiología central mediante software IBIS (Imaging Biomarker Information System. Sistema de Información para Biomarcadores de

Formación de Imágenes) a efectos de asegurar el posicionamiento exacto del sujeto y la calibración de la máquina.

[00396] La Tabla 40 muestran los resultados de las mediciones efectuadas en el sujeto. Los resultados demuestran incrementos sustanciales en la masa corporal magra y sustanciales disminuciones en la masa grasa después de aproximadamente sólo tres meses de tratamiento con una dosis relativamente baja de STM 434.

Tabla 40										
FECHA	TLBM	ALM	TFM	VFM	SFM	TFDIS	VFDIS	SFDIS	TBMD	RDCOM
30– Dec– 2014	57398	22492	15793	657	353	20,7	65	35	1,383	N/A
31– Mar– 2015	64460	24389	8204	4	321	10,8	1,4	98,6	1,365	N/A
% □	12,30%	8,40%	–48%	99%	9,1%	47,8%	97,8%	282%	–1,3%	N/A
TLBM= masa corporal magra total (total lean body mass); ALM= masa apendicular magra (Appendicular lean mass); TFM= masa grasa total (total fat mass); VFM= masa grasa visceral (visceral fat mass); SFM= masa grasa subcutánea (subcutaneous fat mass); TBMD=densidad mineral total de los huesos (total bone mineral density); TFDIS= distribución de la grasa total (total fat distribution); VFDIS= distribución de la grasa visceral (visceral fat distribution); SFDIS=distribución de la grasa subcutánea (subcutaneous fat distribution).										

[00397] Si bien la invención ha sido particularmente mostrada y descrita con referencia a una forma de realización preferida y a diversas formas de realización alternativas, los expertos en la técnica comprenderán que es posible efectuar diversos cambios en la forma y en los detalles sin apartarse del espíritu y alcances de la invención.

[00398] Todas las secuencias, patentes emitidas y solicitudes de patente mencionadas en el cuerpo de la presente memoria descriptiva se incorporan en la presente en su totalidad, como referencia, para todas las finalidades.

SECUENCIAS

SEQ ID NO	Descripción
1	Dominio extracelular ActRIIB, polinucleótido
2	Dominio extracelular ActRIIB, polipéptido
3	svActRIIB (E28W, S44T) polinucleótido con secuencia de señal
4	svActRIIB (E28W, S44T) polipéptido con secuencia de señal
5	svActRIIB (E28W, S44T) polinucleótido sin secuencia de señal
6	svActRIIB (E28W, S44T) polipéptido sin secuencia de señal
7	svActRIIB-Fc (E28W, S44T) polinucleótido con secuencia de señal
8	svActRIIB-Fc (E28W, S44T) polipéptido con secuencia de señal
9	svActRIIB-Fc (E28W, S44T) polinucleótido sin secuencia de señal
10	svActRIIB-Fc (E28W, S44T) polipéptido sin secuencia de señal (STM 434)
11	svActRIIB (E28Y, S44T) polinucleótido con secuencia de señal
12	svActRIIB (E28Y, S44T) polipéptido con secuencia de señal
13	svActRIIB (E28Y, S44T) polinucleótido sin secuencia de señal
14	svActRIIB (E28Y, S44T) polipéptido sin secuencia de señal
15	svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) polinucleótido con secuencia de señal
16	svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) polipéptido con secuencia de señal
17	svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) polinucleótido sin secuencia de señal
18	svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) polipéptido sin secuencia de señal
19	ActRIIB (E28W) polipéptido, sin secuencia de señal
20	ActRIIB-Fc (E28W) polinucleótido, sin secuencia de señal
21	ActRIIB-Fc (E28W) polipéptido, sin secuencia de señal
22	Secuencia polipeptídica IgG2Fc
23	Secuencia polipeptídica IgG1Fc
24	Secuencia polipeptídica IgG4 Fc
25	Secuencia de aminoácidos de linker
26	Secuencia polinucleótida de Hinge linker #1
27	Secuencia peptídica de Hinge linker #1

SEQ ID NO	SECUENCIA			
1	ATGACGGCGC	CCTGGGTGGC	CCTCGCCCTC	CTCTGGGGAT
	CGCTGTGCGC	CGGCTCTGGG	CGTGGGGAGG	CTGAGACACG

	GGAGTGCATC ACCAACCAGA ACAAGCGGCT TGGCACCATC GACTTCAACT AGGAGAACCC CTTCTGCAAC GGCCCGGAAG CC	TACTACAACG GCGGCCTGGA GCACTGCTAC GAGCTCGTGA GCTACGATAG CCAGGTGTAC GAGCGCTTCA TCACGTACGA GCCACCCCCG ACAGCCCCCA	CCAACTGGGA GCGCTGCGAA GCCTCCTGGC AGAAGGGCTG GCAGGAGTGT TTCTGCTGCT CTCATTTGCC GCCACCCCCG ACAGCCCCCA	GCTGGAGCGC GGCGAGCAGG GCAACAGCTC CTGGCTAGAT GTGGCCACTG GTGAAGGCAA AGAGGCTGGG ACAGCCCCCA
2	MTAPWVALAL GEQDKRLHCY VATEENPQVY	LWGSLCAGSG ASWRNSSGTI FCCCEGNFCN	RGEAETRECI ELVKKGCWLD ERFTHLPEAG	YYNANWELER TNQSGLERCE DFNCYDRQEC GPEVTYEPPTAPT
3	ATGGAGTTTG TAAGAGGTGT CAACGCCAAC CTGGAGCGCT GCTACGCCTC CGTGAAGAAG GATAGGCAGG TGTAATTCTG CTTCACTCAT TACGAGCCAC	GGCTGAGCTG CCAGTGTGAG TGGGAGCTGG GCGAAGGCGA CTGGCGCAAC GGCTGCTGGC AGTGTGTGGC CTGCTGTGAG TTGCCAGAGG CCCCGACAGC CCCCACC	GGTTTTCTC ACACGGTGGT AGCGCACCAA GCAGGACAAG AGCTCTGGCA TAGATGACTT CACTGAGGAG GGCAACTTCT CTGGGGGCCC GGAAGTCACG	GTTGCTCTTT GCATCTACTA CCAGACCGGC CGGCTGCACT CCATCGAGCT CAACTGCTAC AACCCCCAGG GCAACGAGCG GGAAGTCACG
4	MEFGLSWVFL LERCEGEQDK NPQVYFCCCE	VALLRGVQCE RLHCYASWRN GNFCNERFTH	TRWCIYYNAN GCWLDDFNCY LPEAGGPEVT	WELERTNQTG DRQECVATEE YEPPTAPT
53	GAGACACGGT TGGAGCGCAC CGAGCAGGAC AACAGCTCTG GGCTAGATGA GGCCACTGAG GAGGGCAACT AGGCTGGGGG	GGTGCATCTA CAACCAGACC AAGCGGCTGC GCACCATCGA CTTCAACTGC GAGAACCCCC TCTGCAACGA CCCGGAAGTC	CTACAACGCC GGCCTGGAGC ACTGCTACGC GCTCGTGAAG TACGATAGGC AGGTGTAATT GCGCTTCACT	AACTGGGAGC GCTGCGAAGG CTCCTGGCGC AAGGGCTGCT AGGAGTGTGT CTGCTGCTGT CATTTGCCAG
6	ETRWCIYYNA KGCWLDDFNC TYEPPTAPT	NWELERTNQT YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV	GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK GAGGAGGAGG GGGGGAGGAT CTGTGGCAGG	GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK GAGGAGGAGG GGGGGAGGAT CTGTGGCAGG
7	ATGGAGTTTG TAAGAGGTGT CAACGCCAAC CTGGAGCGCT GCTACGCCTC CGTGAAGAAG GATAGGCAGG TGTAATTCTG CTTCACTCAT TACGAGCCAC CTGTCGAGTG ACCGTCAGTC CCCGGACCCC CCACGAAGAC GGCGTGGAGG AGCAGTTCAA CGTTGTGCAC TGCAAGGTCT AAACCATCTC GGTGTACACC AACCAGGTCA CCAGCGACAT GGAGAACAAC	GGCTGAGCTG CCAGTGTGAG TGGGAGCTGG GCGAAGGCGA CTGGCGCAAC GGCTGCTGGC AGTGTGTGGC CTGCTGTGAG TTGCCAGAGG CCCCGACAGC CCCACCGTGC TGAGGTCACG CCCGAGGTCC TGCATAATGC CAGCACGTTC CAGGACTGGC CCAACAAAGG CAAAACCAAA CTGCCCCCAT GCCTGACCTG CGCCGTGGAG TACAAGACCA	GGTTTTCTC ACACGGTGGT AGCGCACCAA GCAGGACAAG AGCTCTGGCA TAGATGACTT CACTGAGGAG GGCAACTTCT CTGGGGGCCC CCCCACCGGA CCAGCACCAAC TGCGTGGTGG AGTTCAACTG CAAGACAAAG CGTGTGGTCA TGAACGGCAA CCTCCCAGCC GGGCAGCCCC CCCGGGAGGA CCTGGTCAAA TGGGAGAGCA CACCTCCCAT	GTTGCTCTTT GCATCTACTA CCAGACCGGC CGGCTGCACT CCATCGAGCT CAACTGCTAC AACCCCCAGG GCAACGAGCG GGAAGTCACG GGGGGAGGAT CTGTGGCAGG TGGACGTGAG GTACGTGGAC CCACGGGAGG GCGTCCTCAC GGAGTACAAG CCCATCGAGA GAGAACCACA GATGACCAAG GGCTTCTATC ATGGGCAGCC GCTGGACTCC

	GACGGCTCCT AGAGCAGGTG GATGCATGAG CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA A	TCTTCCTCTA GCAGCAGGGG GCTCTGCACA	CAGCAAGCTC AACGTCTTCT ACCACTACAC	ACCGTGGACA CATGCTCCGT GCAGAAGAGC
8	MEFGLSWVFL LERCEGEQDK NPQVYFCCCE PAPPVAGPSV GVEVHNAKTK CKVSNKGLPA GFYPSDIAVE NVFSCSVMHE LSLSPGK	VALLRGVQCE RLHCYASWRN GNFCNERFTH LMISRTPEVT PREEQFNSTF PIEKTISKTK WESNGQPENN ALHNHYTQKS	TRWCIYYNAN SSGTIELVKK LPEAGGPEVT CVVVDVSHED RVVSVLTVVH QPREPQVYT LPPSREEMTK YKTPPMLDS DGSFFLYSKL	WELERTNQTG DRQECVATEE GGGSVECPPC PEVQFNWYVD QDWLNGKEYK NQVSLTCLVK TVDKSRWQQG
9	GAGACACGGT TGGAGCGCAC CGAGCAGGAC AACAGCTCTG GGCTAGATGA GGCCACTGAG GAGGGCAACT AGGCTGGGGG AGCCCCACC TGCCCAGCAC TCCCCCAA CCCTGAGGTC GACCCCGAGG AGGTGCATAA CAACAGCACG CACCAGGACT TCTCCAACAA CTCCAAAACC ACCCTGCCCC TCAGCCTGAC CATCGCCGTG AACTACAAGA CTACAGCAAG GGGAACGTCT ACAACCACTA	GGTGCATCTA CAACCAGACC AAGCGGCTGC GCACCATCGA CTTCAACTGC GAGAACCCCC TCTGCAACGA CCCGGAAGTC GGAGGGGGGAG CACCTGTGGC ACCCAAGGAC ACGTGCGTGG TCCAGTTCAA TGCCAAGACA TTCCGTGTGG GGCTGAACGG AGGCCTCCCA AAAGGGCAGC CATCCCGGGA CTGCCTGGTC GAGTGGGAGA CCACACCTCC CTCACCGTGG TCTCATGCTC	CTACAACGCC GGCCTGGAGC ACTGCTACGC GCTCGTGAAG TACGATAGGC AGGTGTA GCGCTTCACT ACGTACGAGC GATCTGTCGA AGGACCGTCA ACCCTCATGA TGGTGGACGT CTGGTACGTG AAGCCACGGG TCAGCGTCTT CAAGGAGTAC GCCCCATCG CCCGAGAACC GGAGATGACC AAAGGCTTCT GCAATGGGCA ACAAGAGCAG CGTGATGCAT	AACTGGGAGC GCTGCGAAGG CTCCTGGCGC AAGGGCTGCT AGGAGTGTGT CTGCTGCTGT CATTTGCCAG CACCCCCGAC GTGCCCACCG GTCTTCCTCT TCTCCCGGAC GAGCCACGAA GACGGCGTGG AGGAGCAGTT CACCGTTGTG AAGTGCAAGG AGAAAACCAT ACAGGTGTAC AAGAACCAGG ATCCCAGCGA GCCGGAGAAC CCTTCTTCTC GTGGCAGCAG GAGGCTCTGC TGTCTCCGGG TAAA
10	ETRWCIIYNA KGCWLDDFNC TYEPPPTAPT TCVVVDVSHE FRVVSVLTVV TLPPSREEMT SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK	NWELERTNQT YDRQECVATE GGGGSVECPP DPEVQFNWYV HGDWLNKEY KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPMLD	GLERCEGEQD ENPQVYFCCC CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD LMISRTPEV KGQPREPQVY ACAAGAGCAG CGTGATGCAT	NSSGTIELVK EGNFCNERFT HLPEAGGPEV KPREEQFNST KCKVSNKGLP APIEKTISKTK GQPREPQVY GAGGCTCTGC
11	ATGGAGTTTG TAAGAGGTGT CAACGCCAAC CTGGAGCGCT GCTACGCCTC CGTGAAGAAG GATAGGCAGG TGTA CTTCACTCAT TACGAGCCAC	GGCTGAGCTG CCAGTGTGAG TGGGAGCTGG GCGAAGGCGA CTGGCGCAAC GGCTGCTGGC AGTGTGTGGC CTGCTGTGAG TTGCCAGAGG CCCCGACAGC	GGTTTTCTC ACACGGTACT AGCGCACCAA GCAGGACAAG AGCTCTGGCA TAGATGACTT CACTGAGGAG GGCAACTTCT CTGGGGGCCC	GTTGCTCTTT GCATCTACTA CCAGACCGGC CGGCTGCACT CCATCGAGCT CAACTGCTAC AACCCCCAGG GCAACGAGCG GGAAGTCACG
12	MEFGLSWVFL RLHCYASWRN GNFCNERFTH	VALLRGVQCE SSGTIELVKK LPEAGGPEVT	TRYCIYYNAN GCWLDDFNCY DRQECVATEE	WELERTNQTG LERCEGEQDK NPQVYFCCCE
13	GAGACACGGT	ACTGCATCTA	CTACAACGCC	AACTGGGAGC

	TGGAGCGCAC CGAGCAGGAC AACAGCTCTG GGCTAGATGA GGCCACTGAG GAGGGCAACT AGGCTGGGGG AGCCCCACC	CAACCAGACC AAGCGGCTGC GCACCATCGA CTTCAACTGC GAGAACCCCC TCTGCAACGA CCCGGAAGTC	GGCCTGGAGC ACTGCTACGC GCTCGTGAAG TACGATAGGC AGGTGTACTT GCGCTTCACT ACGTACGAGC	GCTGCGAAGG CTCCTGGCGC AAGGGCTGCT AGGAGTGTGT CTGCTGCTGT CATTTGCCAG CACCCCCGAC
14	ETRYCIYYNA NWELERTNQT GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT			
15	ATGGAGTTTG TAAGAGGTGT CAACGCCAAC CTGGAGCGCT GCTACGCCTC CGTGAAGAAG GATAGGCAGG TGTAATTCTG CTTCACTCAT TACGAGCCAC CTGTCGAGTG ACCGTCAGTC CCCGGACCCC CCACGAAGAC GGCGTGGAGG AGCAGTTCAA CGTTGTGCAC TGCAAGGTCT AAACCATCTC GGTGACACC AACCAGGTCA CCAGCGACAT GGAGAACAAC GACGGCTCCT AGAGCAGGTG GATGCATGAG CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA A	GGCTGAGCTG CCAGTGTGAG TGGGAGCTGG GCGAAGGCGA CTGGCGCAAC GGCTGCTGGC AGTGTGTGGC CTGCTGTGAG TTGCCAGAGG CCCCGACAGC CCCACCGTGC TTCCTCTTCC TGAGGTCACG CCCAGAGTCC TGCATAATGC CAGCACGTTC CAGGACTGGC CCAACAAAGG CAAAACCAAA CTGCCCCCAT GCCTGACCTG CGCCGTGGAG TACAAGACCA TCTTCCTCTA GCAGCAGGGG GCTCTGCACA	GGTTTTCTC ACACGGTACT AGCGCACCAA GCAGGACAAG AGCTCTGGCA TAGATGACTT CACTGAGGAG GGCAACTTCT CTGGGGGCCC CCCCACCGGA CCAGCACACC TGCCTGGTGG AGTTCAACTG CAAGACAAAG CGTGTGGTCA TGAACGGCAA CCTCCCAGCC GGGCAGCCCC CCCAGGAGGA CCTGGTCAAA TGGGAGAGCA CACCTCCCAT CAGCAAGCTC AACGTCTTCT ACCACTACAC	GTTGCTCTTT GCATCTACTA CCAGACCGGC CGGCTGCACT CCATCGAGCT CAACTGCTAC AACCCCCAGG GCAACGAGCG GGAAGTCACG GGGGGAGGAT CTGTGGCAGG CTCATGATCT TGGACGTGAG GTACGTGGAC CCACGGGAGG GCGTCTCTAC GGAGTACAAG CCCATCGAGA GAGAACCACA GATGACCAAG GGCTTCTATC ATGGGCAGCC GCTGGACTCC ACCGTGGACA CATGCTCCGT GCAGAAGAGC
16	MEFGLSWVFL VALLRGVQCE TRYCIYYNAN WELERTNQTG LERCEGEQDK RLHCYASWRN SSGTIELVKK GCWLDDFNCY DRQECVATEE NPQVYFCCCE GNFCNERFTH LPEAGGPEVT YEPPPTAPTG GGSVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK			
17	GAGACACGGT TGGAGCGCAC CGAGCAGGAC AACAGCTCTG GGCTAGATGA GGCCACTGAG GAGGGCAACT AGGCTGGGGG AGCCCCACC TGCCCAGCAC TCCCCCAAA CCCTGAGGTC GACCCCGAGG	ACTGCATCTA CAACCAGACC AAGCGGCTGC GCACCATCGA CTTCAACTGC GAGAACCCCC TCTGCAACGA CCCGGAAGTC GGAGGGGGGAG CACCTGTGGC ACCCAAGGAC ACGTGCGTGG TCCAGTTCAA	CTACAACGCC GGCCTGGAGC ACTGCTACGC GCTCGTGAAG TACGATAGGC AGGTGTACTT GCGCTTCACT ACGTACGAGC GATCTGTCGA AGGACCGTCA ACCCTCATGA TGGTGGACGT CTGGTACGTG	AACTGGGAGC GCTGCGAAGG CTCCTGGCGC AAGGGCTGCT AGGAGTGTGT CTGCTGCTGT CATTTGCCAG CACCCCCGAC GTGCCCACCG GTCTTCTCT TCTCCCGGAC GAGCCACGAA GACGGCGTGG

	AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCACGGG AGGAGCAGTT CAACAGCACG TTCCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTTGTG CACCAGGACT GGCTGAACGG CAAGGAGTAC AAGTGAAGG TCTCCAACAA AGGCCTCCCA GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAACC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACACCTCC CATGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAA
18	ETRYCIYYNA NWELERTNQT GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGGSVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK TKGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
19	ETRWCIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT
20	GAGACACGGT GGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC GGCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT GGCTAGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAGGGCAACT TCTGCAACGA GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC CACCCCCGAC AGCCCCACC GGAGGAGGAG GATCTGTCTGA GTGCCCACCG TGCCCAGCAC CACCTGTGGC AGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAA AAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACGTGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCCGAGG TCCAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCACGGG AGGAGCAGTT CAACAGCACG TTCCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTTGTG CACCAGGACT GGCTGAACGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGGCCTCCCA GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAACC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACACCTCC CATGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAA
21	ETRWCIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGGSVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK TKGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
22	APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC KVSNNKGLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSLSPGK

23	APELLGGPSV FLFPPKPKDI LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVG GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
24	APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK
25	GGGGS
26	GGAGGGGGAG GATCTGTCTGA GTGCCCACCG TGCCCA
27	GGGGSVECPP CP