

**SOLICITUD DE PATENTE**  
**para**  
**FORMULACIÓN LIOFILIZADA DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL CONTRA**  
**TRANSTIRRETINA**

5

Inventores:       Andrea Hawe  
                          Feilitzschstraße 32  
                          80801 München  
                          Alemania  
10                    Ciudadanía alemana

                          Ruedeeporn Tantipolphan  
                          Euckenstraße 29  
                          81369 München  
15                    Alemania  
                          Ciudadanía tailandesa

                          Stefan Heindl  
                          Schubertgasse 82  
20                    2380 Perchtoldsdorf  
                          Austria  
                          Ciudadanía austríaca

                          Jay Soto  
25                    San Francisco del sur  
                          California  
                          Ciudadanía estadounidense

                          Cesionario:       Prothena Biosciences Limited

30

## **FORMULACIÓN LIOFILIZADA DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL CONTRA LA TRANSTIRRETINA**

### **REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUD RELACIONADA**

5 [001] Esta solicitud reivindica el beneficio de US 62/592 294 presentada el 29 de noviembre de 2018, que se incorporan en su totalidad por referencia a todos los efectos.

### **REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS**

[002] Esta solicitud incluye un listado de secuencias electrónico en un archivo llamado 519102\_SEQLIST.txt, creado el 28 de noviembre de 2018 y que contiene 140,679 bytes, que  
10 se incorpora por referencia.

### **ANTECEDENTES**

[003] Se cree que varias enfermedades son causadas por el plegamiento anormal y la agregación de proteínas específicas de la enfermedad. Estas proteínas pueden acumularse en acumulaciones patológicas de diagnóstico, conocidas como amiloides, que son visualizadas por  
15 ciertas manchas histológicas. Se piensa que los amiloides provocan respuestas inflamatorias y tienen múltiples consecuencias negativas para los tejidos implicados. Además, pueden existir agregados más pequeños de proteína anormalmente plegada y ejercer efectos citotóxicos.

[004] La transtiretina (TTR) es una de las muchas proteínas que se sabe que se pliegan erróneamente y se agregan (por ejemplo, se someten a amiloidogénesis). La amiloidosis  
20 relacionada con la transtiretina abarca dos formas de enfermedad: LA enfermedad familiar que se origina por el plegamiento erróneo de un TTR mutado o variante y una enfermedad no genética esporádica causada por la desagregación del TTR de tipo salvaje. El proceso de amiloidogénesis TTR puede causar patología en el sistema nervioso y/o en el corazón, así como en otros tejidos.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION REIVINDICADA**

[005] La invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden (a) un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende tres CDR de SEQ ID NO:61 y una región variable de cadena ligera madura que comprende tres CDR de SEQ ID NO:70, salvo por que cada una de las posiciones H52 y L26  
30 según la numeración de Kabat puede ser independientemente N o S, o un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende tres

CDR de SEQ ID NO:1 y una región variable de cadena ligera madura que comprende tres CDR de SEQ ID NO:16, en donde el anticuerpo se encuentra presente a una concentración dentro del intervalo de alrededor de 25 mg/mL a alrededor de 75 mg/mL; (b) un amortiguador presente a una concentración de alrededor de 20 mM, en donde el amortiguador es citrato, histidina, fosfato o succinato; (c) un azúcar presente a una concentración dentro del intervalo de alrededor de 205 mM a alrededor de 260 mM, en donde el azúcar es sacarosa o trehalosa o, si el azúcar se encuentra ausente hay presente alrededor de 160 mM de arginina; y (d) un tensioactivo presente a una concentración dentro del intervalo de alrededor de 0,01 % a alrededor de 1 % en peso; en donde la formulación se caracteriza por un pH dentro del intervalo de alrededor de 5,0 a alrededor de 6,5; siempre que: (i) si hay presente un amortiguador de histidina o succinato, el pH sea de alrededor de 6,0; (ii) si hay presente un amortiguador de fosfato, el pH sea de alrededor de 6,5; y (iii) si hay presente histidina y trehalosa el tensioactivo sea a. PS80; o b. PS20, siempre que si hay PS20 presente, también haya presente alrededor de 25 mM de L-arginina. Opcionalmente, la formulación básicamente carece de manitol o sorbitol. Opcionalmente, la formulación que comprende un anticuerpo monoclonal tal como se describe en (a) básicamente carece de manitol y sorbitol..

[006] En algunas formulaciones, el amortiguador es histidina. Opcionalmente, el azúcar se encuentra presente en un intervalo de alrededor de 230 mM a alrededor de 250 mM, opcionalmente de alrededor de 230 mM a alrededor de 240 mM. Opcionalmente, el azúcar es trehalosa. Opcionalmente, el azúcar es sacarosa y el tensioactivo es PS20 o PX188. Opcionalmente, el tensioactivo es PS20 a una concentración de 0,02 % p/p. Opcionalmente, el tensioactivo es PX188 a una concentración de 0,04 % p/p. En algunas formulaciones, hay presente 160mM de arginina. Opcionalmente, el azúcar se encuentra presente y es trehalosa. Opcionalmente, la trehalosa se encuentra presente a una concentración de 205 mM. Opcionalmente, el tensioactivo es PS20.

[007] En algunas formulaciones, el amortiguador es citrato. Opcionalmente, el azúcar se encuentra presente a 230 mM. Opcionalmente, el tensioactivo es PS20 al 0,02 %. En algunas formulaciones, el amortiguador es fosfato. Opcionalmente, el azúcar se encuentra presente y es sacarosa. En algunas formulaciones, el amortiguador es succinato. Opcionalmente, el azúcar se encuentra presente y es sacarosa.

[008] Algunas formulaciones comprenden (a) 20 mM de citrato, 230 mM de trehalosa y

PS20 al 0,02 % p/p a pH 5; (b) 20 mM de histidina, 230 mM de sacarosa y PS20 0,02 % p/p; (c) 20 mM de fosfato, 230 mM de sacarosa y PS20 al 0,02 % p/p a pH 6,5; (d) 20 mM de citrato, 230 mM de sacarosa y PS20 al 0,02 % p/p a pH 6,5; (e) 20 mM de histidina, 230 mM de trehalosa y PS80 al 0,02 % p/p; (f) 20 mM de histidina, PS20 al 0,02 % p/p y 160 mM de L-arginina; (g) 20 mM de histidina, 240 mM de sacarosa y PX188 al 0,04 % p/p; (h) 20 mM de succinato, 240 mM de sacarosa y PS20 al 0,02 % p/p a un pH de 6,0; o (i) 20 mM de histidina, 205 mM de trehalosa, PS20 al 0,02 % p/p y 25 mM de L-arginina. Opcionalmente, la formulación consiste básicamente en el anticuerpo y alrededor de: (a) 20 mM de citrato, 230 mM de trehalosa y PS20 al 0,02 % p/p a pH 5; (b) 20 mM de histidina, 230 mM de sacarosa y PS20 0,02 % p/p; (c) 20 mM de fosfato, 230 mM de sacarosa y PS20 al 0,02 % p/p a pH 6,5; (d) 20 mM de citrato, 230 mM de sacarosa y PS20 al 0,02 % p/p a pH 6,5; (e) 20 mM de histidina, 230 mM de trehalosa y PS80 al 0,02 % p/p; (f) 20 mM de histidina, PS20 al 0,02 % p/p y 160 mM de L-arginina; (g) 20 mM de histidina, 240 mM de sacarosa y PX188 al 0,04 % p/p; (h) 20 mM de succinato, 240 mM de sacarosa y PS20 al 0,02 % p/p a un pH de 6,0; o (i) 20 mM de histidina, 205 mM de trehalosa, PS20 al 0,02 % p/p y 25 mM de L-arginina. Opcionalmente, la formulación consiste básicamente en el anticuerpo y alrededor de: (a) 20 mM de histidina, 240 mM de sacarosa y PX188 al 0,04 % p/p; (b) 20 mM de succinato, 240 mM de sacarosa y PS20 al 0,02 % p/p a un pH de 6,0; o (c) 20 mM de histidina, 205 mM de trehalosa, PS20 al 0,02 % p/p y 25 mM de L-arginina.

[009] En algunas formulaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:65, y una región variable de cadena ligera madura que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:76. Opcionalmente, la formulación consiste básicamente en el anticuerpo a alrededor de 50 mg/ml, y alrededor de 20 mM de histidina, alrededor de 240 mM de sacarosa y alrededor de 0,04 % p/p de PX188.

[010] En algunas formulaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende las tres CDR según Kabat de SEQ ID NO:61, y una región variable de cadena ligera madura que comprende las tres CDR según Kabat de SEQ ID NO:70 salvo por que cada una de las posiciones H52 y L26 según la numeración de Kabat puede ser independientemente N o S.

[011] En algunas formulaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena

pesada madura que comprende las tres CDR según Kabat de SEQ ID NO:1, y una región variable de cadena ligera madura que comprende las tres CDR según Kabat de SEQ ID NO:16.

[012] En algunas formulaciones, el anticuerpo monoclonal es humanizado, quimérico o chapeado. Opcionalmente, el anticuerpo monoclonal es humanizado. Opcionalmente, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:64-66 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:74-76. Opcionalmente, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:5-12 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:19-23. Opcionalmente, la cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:11 y la cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:19. Opcionalmente, la cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:65 y la cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:76.

[013] En formulaciones que comprenden un anticuerpo humanizado, la región variable de cadena pesada madura se fusiona a una región constante de cadena pesada y la región variable de cadena ligera madura se fusiona a una región constante de cadena ligera. Opcionalmente, la región variable de cadena pesada madura está fusionada a una región constante de cadena pesada con la secuencia SEQ ID NO 103 siempre que la lisina de extremo C pueda estar ausente y/o la región variable de cadena ligera madura está fusionada a una región constante de cadena ligera con la secuencia SEQ ID NO 104 o 105.

[014] En algunas formulaciones, el anticuerpo monoclonal se encuentra presente a una concentración de alrededor de 50 mg/mL. En algunas formulaciones, el amortiguador de histidina se encuentra a una concentración de alrededor de 20 mM. En algunas formulaciones, el pH es de alrededor de 5,75 a 6,25. En algunas formulaciones, el azúcar/poliol es sacarosa presente a una concentración de alrededor de 240 mM. En algunas formulaciones, el poloxámero es poloxámero 188 a una concentración de alrededor de 0,04 % en peso. En algunas formulaciones, menos que alrededor de 5 % o 3 % en peso del anticuerpo se encuentra presente como agregado en la formulación. En algunas formulaciones, al menos 95 % o 97 % del anticuerpo en peso se desarrolla como un único pico en análisis de HP-SEC. Algunas

formulaciones son estériles. Algunas formulaciones son estables durante congelación y descongelación. Algunas formulaciones tienen una osmolalidad de alrededor de 270 mOsmol/kg a alrededor de 330 mOsmol/kg.

[015] La invención proporciona también una formulación liofilizada de un anticuerpo que  
5 comprende (a) un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada  
madura que comprende tres CDR de la SEQ ID NO:61 y una región variable de cadena ligera  
madura que comprende tres CDR de la SEQ ID NO:70, salvo por que cada una de las  
posiciones H52 y L26 según la numeración de Kabat puede ser independientemente N o S, o  
un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada madura que  
10 comprende tres CDR de la SEQ ID NO:1 y una región variable de cadena ligera madura que  
comprende tres CDR de SEQ ID NO:16; (b) histidina; (c) un azúcar/poliol; y (d) un poloxámero.  
Opcionalmente, la formulación liofilizada se prepara mediante liofilización de las formulaciones  
antemencionadas. Opcionalmente, la formulación liofilizada se puede reconstituir con agua a  
un pH de entre alrededor de 5,5 y alrededor de 6,5. Opcionalmente, la formulación liofilizada  
15 se puede reconstituir con agua a un pH de alrededor de 6,0. Opcionalmente, la formulación  
liofilizada contiene de alrededor de 10 mg a alrededor de 40 mg del anticuerpo.

[016] La invención proporciona además una formulación liofilizada, que se puede  
reconstituir con agua para proporcionar una solución acuosa que comprende: (a) un anticuerpo  
que comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende tres CDR de  
20 SEQ ID NO:61 y una región variable de cadena ligera madura que comprende tres CDR de  
SEQ ID NO:70, salvo por que cada una de las posiciones H52 y L26 según la numeración de  
Kabat puede ser independientemente N o S, o un anticuerpo monoclonal que comprende una  
región variable de cadena pesada madura que comprende tres CDR de SEQ ID NO:1 y una  
región variable de cadena ligera madura que comprende tres CDR de SEQ ID NO:16 en donde  
25 el anticuerpo se encuentra presente a una concentración dentro del intervalo de alrededor de  
25 mg/mL a alrededor de 75 mg/mL; (b) amortiguador presente a una concentración dentro de  
un intervalo de alrededor de 10 mM a alrededor de 30 mM; (c) azúcar/poliol presente a una  
concentración dentro de un intervalo de alrededor de 220 mM a alrededor de 260 mM; (d)  
tensoactivo presente a una concentración dentro de un intervalo de alrededor de 0,01 % a  
30 alrededor de 0,1 % en peso; y (e) un pH dentro de un intervalo de alrededor de 5,5 a alrededor  
de 7,0.

[017] En algunas formulaciones liofilizadas, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:64-66 y una región variable de cadena ligera madura que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:74-76, o un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:5-12 y una región variable de cadena ligera madura que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:19-23. Opcionalmente, la formulación liofilizada se puede reconstituir con agua de modo que el anticuerpo se encuentre presente a una concentración de alrededor de 50 mg/mL. Opcionalmente, el amortiguador comprende histidina. Opcionalmente, la formulación liofilizada se puede reconstituir con agua de modo que el pH sea alrededor de 6,0. Opcionalmente, el azúcar/poliol es sacarosa. Opcionalmente, el tensioactivo es poloxámero. Opcionalmente, el poloxámero es PX188.

[018] En algunas formulaciones liofilizadas, (a) el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:64-66 y una región variable de cadena ligera madura que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:74-76 y se puede reconstituir a una concentración de alrededor de 50 mg/ml; (b) el amortiguador es histidina y se puede reconstituir a una concentración de alrededor de 20 mM; (c) el azúcar/poliol es sacarosa y se puede reconstituir a una concentración de alrededor de 240 mM; y (d) el tensioactivo es poloxámero 188 y se puede reconstituir a una concentración de alrededor de 0,04 % en peso. Opcionalmente, la formulación liofilizada se puede reconstituir con agua de modo que el pH sea alrededor de 6,0. Opcionalmente, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:65 y una región variable de cadena ligera madura que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:76. Opcionalmente, la región variable de cadena pesada madura se fusiona a una región constante de cadena pesada que tiene la secuencia de la SEQ ID NO:103 y la región variable de cadena ligera madura se fusiona a una región constante de cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO:104. En estas formulaciones liofilizadas, al menos 95 o 97 % del anticuerpo se desarrolla como un único pico en HP-SEC luego del almacenamiento durante un máximo de 3 meses a 2-8 °C.

[019] La invención proporciona además un método para reconstituir la formulación liofilizada que comprende combinar la formulación liofilizada con agua estéril para producir una formulación líquida. Opcionalmente, comprende además introducir la formulación reconstituida en una bolsa de fluido isotónico para infusión. Opcionalmente, la formulación liofilizada se encuentra en forma de polvo o en forma de una espuma sólida en un frasco.

[020] La invención proporciona además una forma de dosificación liofilizada estéril de una formulación de anticuerpo en un frasco de 20ml que consiste básicamente en: (i) un anticuerpo dentro de un intervalo de alrededor de 225-275 mg; (ii) histidina dentro de un intervalo de alrededor de 15-19 mg; (iii) poloxámero PX188 dentro de un intervalo de alrededor de 2-2,5 mg; y; (iv) sacarosa dentro de un intervalo de alrededor de 400-490 mg; en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende tres CDR de la SEQ ID NO:61 y una región variable de cadena ligera madura que comprende tres CDR de la SEQ ID NO:70, salvo por que cada una de las posiciones H52 y L26 según la numeración de Kabat puede ser independientemente N o S, o un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende tres CDR de la SEQ ID NO:1 y una región variable de cadena ligera madura que comprende tres CDR de la SEQ ID NO:16. Opcionalmente, el frasco tiene contenidos que consisten básicamente en: (i) alrededor de 250 mg del anticuerpo; (ii) alrededor de 16,8 mg de L-histidina; (iii) alrededor de 2,2 mg del poloxámero PX188; y (iv) alrededor de 445,3 mg de sacarosa. Opcionalmente, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende las tres CDR según Kabat de la SEQ ID NO:61, y una región variable de cadena ligera madura que comprende las tres CDR de Kabat de la SEQ ID NO:70 salvo por que cada una de las posiciones H52 y L26 según la numeración de Kabat puede ser independientemente N o S. Opcionalmente, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende las tres CDR según Kabat de la SEQ ID NO:1, y una región variable de cadena ligera madura que comprende las tres CDR según Kabat de la SEQ ID NO:16. Opcionalmente, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:64-66 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:74-76. Opcionalmente, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:5-12 y la región variable de

cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:19-23. Opcionalmente, la cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:65 y la cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:76. Opcionalmente, la cadena pesada madura  
5 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:6 y la cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:21. Opcionalmente, la región variable de cadena pesada madura se fusiona con una región constante de cadena pesada que tiene la secuencia de la SEQ ID NO:103 siempre que la lisina de extremo C pueda estar ausente y/o la región variable de cadena ligera madura se fusiona con una región  
10 constante de cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO:104 o 105. Opcionalmente, la cadena pesada madura tiene la secuencia de la SEQ ID NO:82, salvo por que la lisina de extremo C puede estar ausente, y la cadena ligera madura tiene la secuencia de la SEQ ID NO:86.

[021] La invención proporciona también un método de preparación de la forma de dosificación liofilizada para su administración a un sujeto, que comprende: (i) reconstituir la  
15 formulación de anticuerpo a un volumen de alrededor de 5,0 mL con agua estéril, y (ii) diluir la formulación de anticuerpo reconstituida de la etapa (i) en solución salina normal para infusión. Opcionalmente, el volumen total para la infusión es 250 mL. Opcionalmente, el volumen total para la infusión es 100 mL. Opcionalmente, el volumen total para la infusión es 500 mL.

[022] La invención proporciona también una formulación reconstituida que resulta de la reconstitución de formulaciones liofilizadas. Algunas formulaciones reconstituidas comprenden el anticuerpo a una concentración de alrededor de 50 mg/mL, el amortiguador de histidina a una  
20 concentración de alrededor de 20 mM, poloxámero a una concentración de alrededor de 0,04 % en peso, y a un pH de alrededor de 6,0. Opcionalmente, al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % del anticuerpo se desarrolla como un único pico en cromatografía de exclusión por tamaño de alta  
25 presión.

[023] La invención también proporciona un método para tratar o efectuar profilaxis en un sujeto que padece o tiene riesgo de padecer amiloidosis mediada por transtirretina, que comprende la administración al sujeto de un esquema eficaz de la formulación farmacéutica o  
30 una forma reconstituida de la formulación liofilizada. Opcionalmente, el sujeto fue tratado previamente con un estabilizador de tetrámeros TTR, un tratamiento con oligonucleótido de

antisentido, un tratamiento con interferencia por el ARN (iARN) o un degradador amiloide. Opcionalmente, el sujeto ya no recibe el tratamiento con el estabilizador de tetrámeros TTR, el tratamiento con oligonucleótidos de antisentido, el tratamiento con interferencia por el ARN (iARN) o el degradador amiloide. Opcionalmente, el sujeto recibe simultáneamente tratamiento con diflunisal. Opcionalmente, el sujeto recibe tratamiento simultáneamente con tafamidis. Opcionalmente, el sujeto recibe tratamiento simultáneamente con un estabilizador de tetrámeros TTR, un tratamiento con oligonucleótido de antisentido, un tratamiento con interferencia por el ARN (iARN) o un degradador amiloide. Opcionalmente, el sujeto recibe tratamiento simultáneamente con tafamidis, diflunisal, patisirán, inotersén, 4'-yodo-4'-desoxidoxorrubicina (IDOX), doxiciclina, ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA), ciclodextrina (CyD) o un anticuerpo anti-SAP. Opcionalmente, el sujeto fue diagnosticado con amiloidosis ATTR. Opcionalmente, el sujeto tiene cardiomiopatía ATTR sin mutaciones. Opcionalmente, el sujeto tiene miocardiopatía ATTR hereditaria o polineuropatía ATTR hereditaria o ambas. Opcionalmente, el sujeto tiene afectación cardíaca por ATTR. Opcionalmente, el sujeto tiene afectación de neuropatía periférica por amiloidosis ATTR. Opcionalmente, el sujeto recibe simultáneamente tafamidis.

[024] La invención también proporciona que una formulación farmacéutica, la forma reconstituida de la formulación liofilizada o la forma reconstituida de la formulación de anticuerpo liofilizada se administre al sujeto por vía intravenosa en forma diluida. Opcionalmente, el diluyente para la forma diluida es solución salina normal. Opcionalmente, el volumen total de la forma diluida que se administra al sujeto es al menos alrededor de 100 mL. Opcionalmente, el volumen total de la forma diluida que se administra al sujeto es al menos alrededor de 250 mL. Opcionalmente, el volumen total de la forma diluida que se administra al sujeto es al menos alrededor de 500 mL. Opcionalmente, el volumen total es de alrededor de 250 mL. Opcionalmente, se administran 0,1, 0,2, 0,3, 1, 3, 10 o 30 mg/kg del anticuerpo al sujeto alrededor de una vez cada 28 días. Opcionalmente, se administran 0,1, 0,2, 0,3, 1 o 3 mg/kg del anticuerpo al sujeto como una infusión en un intervalo de alrededor de 60 a 120 minutos. Opcionalmente, se administran 10 o 30 mg/kg del anticuerpo al sujeto como una infusión durante un intervalo de alrededor de 90 a 180 minutos. Opcionalmente, se premedica al sujeto con un antihistamínico. Opcionalmente, se administra al sujeto difenhidramina dentro de un intervalo de alrededor de 30 a 90 minutos antes de la administración del anticuerpo.

Opcionalmente, se administra al sujeto paracetamol dentro de un intervalo de alrededor de 30 a 90 minutos antes de la administración del anticuerpo. Opcionalmente, la duración del esquema es de al menos 3 meses. Opcionalmente, la duración del esquema es de al menos 12 meses.

5            [025] La invención proporciona además un método de tratamiento o de efectuar profilaxis de un sujeto que padece o tiene riesgo de padecer amiloidosis mediada por transtirretina que comprende la administración de un esquema eficaz de un estabilizador de tetrameros TTR, un tratamiento con oligonucleótido de antisentido, un tratamiento con interferencia por el ARN (iARN) o un degradador amiloide, en donde el sujeto fue tratado  
10            anteriormente con la formulación farmacéutica o una forma reconstituida de la formulación liofilizada tal como se describió anteriormente. Opcionalmente, el sujeto ya no recibe el tratamiento con la formulación farmacéutica. Opcionalmente, el estabilizador de tetrameros TTR es tafamidis o diflunisal. Opcionalmente, el tratamiento con oligonucleótidos de antisentido es inotersén. Opcionalmente, el tratamiento con interferencia por el ARN (iARN) es patisirán o  
15            revusirán. Opcionalmente, los degradadores amiloides son 4'-yodo-4'-desoxidoxorrubicina (IDOX), doxiciclina, ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA), ciclodextrina (CyD) o un anticuerpo anti-SAP. Opcionalmente, los degradadores amiloides son doxiciclina combinada con ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA). Opcionalmente, el sujeto fue diagnosticado con amiloidosis ATTR. Opcionalmente, el sujeto tiene cardiomiopatía ATTR sin mutaciones. Opcionalmente,  
20            el sujeto tiene miocardiopatía ATTR hereditaria. Opcionalmente, el sujeto tiene polineuropatía ATTR hereditaria. Opcionalmente, el sujeto tiene afectación cardíaca por ATTR. Opcionalmente, el sujeto tiene afectación de neuropatía periférica por amiloidosis ATTR. Opcionalmente, la formulación farmacéutica, la forma reconstituida de la formulación liofilizada o la forma reconstituida de la formulación de anticuerpo liofilizada se administra al sujeto por  
25            vía intravenosa en forma diluida. Opcionalmente, el diluyente para la forma diluida es solución salina normal. Opcionalmente, el volumen total de la forma diluida que se administra al sujeto es al menos alrededor de 100 mL. Opcionalmente, el volumen total de la forma diluida que se administra al sujeto es al menos alrededor de 250 mL. Opcionalmente, el volumen total de la forma diluida que se administra al sujeto es al menos alrededor de 500 mL. Opcionalmente, el  
30            volumen total es de alrededor de 250 mL. Opcionalmente, se administran 0,1, 0,2, 0,3, 1, 3, 10 o 30 mg/kg del anticuerpo al sujeto alrededor de una vez cada 28 días. Opcionalmente, se

administran 0,1, 0,2, 0,3, 1 o 3 mg/kg del anticuerpo al sujeto como una infusión en un intervalo de alrededor de 60 a 120 minutos. Opcionalmente, se administran 10 o 30 mg/kg del anticuerpo al sujeto como una infusión durante un intervalo de alrededor de 90 a 180 minutos. Opcionalmente, se premedica al sujeto con un antihistamínico. Opcionalmente, se administra al sujeto difenhidramina dentro de un intervalo de alrededor de 30 a 90 minutos antes de la administración del anticuerpo. Opcionalmente, se administra al sujeto paracetamol dentro de un intervalo de alrededor de 30 a 90 minutos antes de la administración del anticuerpo. Opcionalmente, la duración del esquema es de al menos 3 meses. Opcionalmente, la duración del esquema es de al menos 12 meses.

10

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS**

[026] SEQ ID NO: 1 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 9D5 de ratón.

[027] SEQ ID NO: 2 establece la secuencia de aminoácidos de la plantilla de estructura de región variable de cadena pesada de ratón 1SEQ\_H.

15

[028] SEQ ID NO: 3 establece la secuencia de aminoácidos del aceptor variable de cadena pesada ACC # BACO2114.

[029] SEQ ID NO: 4 establece la secuencia de aminoácidos del aceptor variable de cadena pesada ACC # AAX82494.1.

20

[030] SEQ ID NO: 5 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de la versión 1 del anticuerpo 9D5 humanizado (Hu9D5VHv1).

[031] SEQ ID NO: 6 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 9D5 humanizado versión 2 (Hu9D5VHv2).

[032] SEQ ID NO: 7 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 9D5 humanizado versión 2b (Hu9D5VHv2b).

25

[033] SEQ ID NO: 8 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 9D5 humanizado versión 3 (Hu9D5VHv3).

[034] SEQ ID NO: 9 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 9D5 humanizado versión 3b (Hu9D5VHv3b).

30

[035] SEQ ID NO: 10 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 9D5 humanizado versión 4 (Hu9D5VHv4).

[036] SEQ ID NO: 11 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de

cadena pesada del anticuerpo 9D5 humanizado versión 4b (Hu9D5VHv4b).

[037] SEQ ID NO: 12 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 9D5 humanizado versión 5 (Hu9D5VHv5).

5 [038] SEQ ID NO: 13 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-H1 del anticuerpo 9D5 de ratón.

[039] SEQ ID NO: 14 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-H2 del anticuerpo 9D5 de ratón

[040] SEQ ID NO: 15 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-H3 del anticuerpo de 9D5 de ratón.

10 [041] SEQ ID NO: 16 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 9D5 de ratón.

[042] SEQ ID NO: 17 establece la secuencia de aminoácidos de la plantilla de estructura de región variable de cadena ligera de ratón 1MJU\_L.

15 [043] SEQ ID NO: 18 establece la secuencia de aminoácidos variable de cadena ligera del aceptor ACC#ABC66952.

[044] SEQ ID NO: 19 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 9D5 humanizado versión 1 (Hu9D5VLv1).

[045] SEQ ID NO: 20 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 9D5 humanizado versión 2 (Hu9D5VLv2).

20 [046] SEQ ID NO: 21 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 9D5 humanizado versión 3 (Hu9D5VLv3).

[047] SEQ ID NO: 22 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 9D5 humanizado versión 4 (Hu9D5VLv4).

25 [048] SEQ ID NO: 23 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 9D5 humanizado versión 5 (Hu9D5VLv5).

[049] SEQ ID NO: 24 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-L1 del anticuerpo 9D5 de ratón.

[050] SEQ ID NO: 25 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-L2 del anticuerpo de ratón 9D5.

30 [051] SEQ ID NO: 26 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-L3 del anticuerpo 9D5 de ratón.

[052] SEQ ID NO: 27 establece la secuencia de aminoácidos de cadena pesada 9D5 humanizada versión 1.

[053] SEQ ID NO: 28 establece la secuencia del aminoácido de cadena pesada 9D5 humanizado versión 2.

5 [054] SEQ ID NO: 29 establece la secuencia del aminoácido de cadena pesada 9D5 humanizado versión 2b.

[055] SEQ ID NO: 30 establece la secuencia del aminoácido de cadena pesada 9D5 humanizado versión 3.

10 [056] SEQ ID NO: 31 establece la secuencia del aminoácido de cadena pesada humanizado 9D5 versión 3b.

[057] SEQ ID NO: 32 establece la secuencia del aminoácido de cadena pesada 9D5 humanizado versión 4.

[058] SEQ ID NO: 33 establece la secuencia del aminoácido de cadena pesada 9D5 humanizado versión 4b.

15 [059] SEQ ID NO: 34 establece la secuencia del aminoácido de cadena pesada 9D5 humanizado versión 5.

[060] SEQ ID NO: 35 establece la secuencia del aminoácido de cadena ligera 9D5 humanizado versión 1.

20 [061] SEQ ID NO: 36 establece la secuencia del aminoácido de cadena ligera 9D5 humanizado versión 2.

[062] SEQ ID NO: 37 establece la secuencia del aminoácido de cadena ligera 9D5 humanizado versión 3.

[063] SEQ ID NO: 38 establece la secuencia del aminoácido de cadena ligera 9D5 humanizado versión 4.

25 [064] SEQ ID NO: 39 establece la secuencia del aminoácido de cadena ligera 9D5 humanizado versión 5.

[065] SEQ ID NO: 40 establece la secuencia de ácido nucleico de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 9D5 de ratón con péptido de señalización.

30 [066] SEQ ID NO: 41 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 9D5 de ratón con péptido de señalización.

[067] SEQ ID NO: 42 establece la secuencia de ácido nucleico de la región variable de

cadena ligera del anticuerpo 9D5 de ratón con péptido de señalización.

[068] SEQ ID NO: 43 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 9D5 de ratón con péptido de señalización.

5 [069] SEQ ID NO: 44 establece la secuencia de ácido nucleico de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 9D5 humanizado versión 1 (Hu9D5VHv1).

[070] SEQ ID NO: 45 establece la secuencia de ácido nucleico de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 9D5 humanizado versión 2 (Hu9D5VHv2).

[071] SEQ ID NO: 46 establece la secuencia de ácido nucleico de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 9D5 humanizado versión 2b (Hu9D5VHv2b).

10 [072] SEQ ID NO: 47 establece la secuencia de ácido nucleico de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 9D5 humanizado versión 3 (Hu9D5VHv3).

[073] SEQ ID NO: 48 establece la secuencia de ácido nucleico de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 9D5 humanizado versión 3b (Hu9D5VHv3b).

15 [074] SEQ ID NO: 49 establece la secuencia de ácido nucleico de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 9D5 humanizado versión 4 (Hu9D5VHv4).

[075] SEQ ID NO: 50 establece la secuencia de ácido nucleico de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 9D5 humanizado versión 4b (Hu9D5VHv4b).

[076] SEQ ID NO: 51 establece la secuencia de ácido nucleico de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 9D5 humanizado versión 5 (Hu9D5VHv5).

20 [077] SEQ ID NO: 52 establece la secuencia de ácido nucleico de la región variable de cadena ligera de la 9D5 humanizado versión anticuerpo 1 (Hu9D5VLv1).

[078] SEQ ID NO: 53 establece la secuencia de ácido nucleico de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 9D5 humanizado versión 2 (Hu9D5VLv2).

25 [079] SEQ ID NO: 54 establece la secuencia de ácido nucleico de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 9D5 humanizado versión 3 (Hu9D5VLv3).

[080] SEQ ID NO: 55 se establece la secuencia de ácido nucleico de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 9D5 humanizado versión 4 (Hu9D5VLv4).

[081] SEQ ID NO: 56 establece la secuencia de ácido nucleico de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 9D5 humanizado versión 5 (Hu9D5VLv5).

30 [082] SEQ ID NO: 57 establece la secuencia de aminoácidos del péptido de señalización de la región variable de la cadena pesada 9D5 del ratón.

[083] SEQ ID NO: 58 establece la secuencia de aminoácidos del péptido de señalización de la región variable de la cadena pesada 9D5 del ratón.

[084] SEQ ID NO: 59 establece la secuencia de aminoácidos del péptido de señalización de la región variable de la cadena ligera 9D5 del ratón.

5 [085] SEQ ID NO: 60 establece la secuencia de ácido nucleico del péptido de señalización de la región variable de la cadena ligera 9D5 de ratón.

[086] SEQ ID NO: 61 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 14G8 de ratón.

10 [087] SEQ ID NO: 62 establece la secuencia de aminoácidos de la plantilla de estructura de región variable de cadena pesada de ratón 1MQK\_H.

[088] SEQ ID NO: 63 establece la secuencia de aminoácidos de variable de cadena pesada del aceptador ACC # AAD30410.1.

[089] SEQ ID NO: 64 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 14G8 humanizado versión 1 (Hu14G8VHv1).

15 [090] SEQ ID NO: 65 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 14G8 humanizado versión 2 (Hu14G8VHv2).

[091] SEQ ID NO: 66 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 14G8 humanizado versión 3 (Hu14G8VHv3).

20 [092] SEQ ID NO: 67 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-H1 del anticuerpo 14G8 de ratón.

[093] SEQ ID NO: 68 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-H2 del anticuerpo 14G8 de ratón.

[094] SEQ ID NO: 69 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-H3 del anticuerpo 14G8 de ratón.

25 [095] SEQ ID NO: 70 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 14G8 de ratón.

[096] SEQ ID NO: 71 establece la secuencia de aminoácidos de la plantilla de estructura de región variable de cadena ligera de ratón 1MJU\_L.

30 [097] SEQ ID NO: 72 establece la secuencia de aminoácidos de variable de cadena ligera del aceptador ACC # ABA71374.1.

[098] SEQ ID NO: 73 establece la secuencia de aminoácidos de variable de cadena

ligera del aceptador ACC # ABC66952.1.

[099] SEQ ID NO: 74 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 14G8 humanizado versión 1 (Hu14G8VLv1).

5 [0100] SEQ ID NO: 75 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 14G8 humanizado versión 2 (Hu14G8VLv2).

[0101] SEQ ID NO: 76 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 14G8 humanizado versión 3 (Hu14G8VLv3).

[0102] SEQ ID NO: 77 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-L1 del anticuerpo 14G8 de ratón.

10 [0103] SEQ ID NO: 78 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-L2 del anticuerpo 14G8 de ratón.

[0104] SEQ ID NO: 79 se establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-L3 del anticuerpo 14G8 de ratón.

15 [0105] SEQ ID NO: 80 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-L1 del anticuerpo 14G8 humanizado versión 3 (Hu14G8VLv3).

[0106] SEQ ID NO: 81 establece la secuencia de aminoácidos de cadena pesada 14G8 humanizado versión 1.

[0107] SEQ ID NO: 82 establece la secuencia del aminoácido de cadena pesada 14G8 humanizado versión 2.

20 [0108] SEQ ID NO: 83 establece la secuencia del aminoácido de cadena pesada 14G8 humanizado versión 3.

[0109] SEQ ID NO: 84 establece la secuencia del aminoácido de cadena ligera 14G8 humanizado versión 1.

25 [0110] SEQ ID NO: 85 establece la secuencia del aminoácido de cadena ligera 14G8 humanizado versión 2.

[0111] SEQ ID NO: 86 establece la secuencia del aminoácido de cadena ligera 14G8 humanizado versión 3.

[0112] SEQ ID NO: 87 establece la secuencia de ácido nucleico de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 14G8 de ratón con péptido de señalización.

30 [0113] SEQ ID NO: 88 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 14G8 de ratón con péptido de señalización.

[0114] SEQ ID NO: 89 establece la secuencia de ácido nucleico de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 14G8 de ratón con péptido de señalización.

[0115] SEQ ID NO: 90 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 14G8 de ratón con péptido de señalización.

5 [0116] SEQ ID NO: 91 establece la secuencia de ácido nucleico de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 14G8 humanizado versión 1 (Hu14G8VHv1).

[0117] SEQ ID NO: 92 establece la secuencia de ácido nucleico de la región variable de cadena del anticuerpo 14G8 humanizado versión 2 (Hu14G8VHv2).

10 [0118] SEQ ID NO: 93 establece la secuencia de ácido nucleico de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 14G8 humanizado versión 3 (Hu14G8VHv3).

[0119] SEQ ID NO: 94 establece la secuencia de ácido nucleico de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 14G8 humanizado versión 1 (Hu14G8VLv1).

[0120] SEQ ID NO: 95 establece la secuencia de ácido nucleico de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 14G8 humanizado versión 2 (Hu14G8VLv2).

15 [0121] SEQ ID NO: 96 establece la secuencia de ácido nucleico de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 14G8 humanizado versión 3 (Hu14G8VLv3).

[0122] SEQ ID NO: 97 establece la secuencia de aminoácido del péptido de señalización de la región variable de cadena pesada 14G8 del ratón.

20 [0123] SEQ ID NO: 98 establece la secuencia de ácido nucleico del péptido de señalización de la región variable de cadena pesada 14G8 de ratón.

[0124] SEQ ID NO: 99 establece la secuencia de aminoácidos del péptido de señalización de la región variable de cadena ligera 14G8 de ratón.

[0125] SEQ ID NO: 100 establece la secuencia de ácido nucleico del péptido de señalización de la región variable de cadena ligera 14G8 de ratón.

25 [0126] SEQ ID NO: 101 establece la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada IgG1 humana ejemplar.

[0127] SEQ ID NO: 102 se establece la secuencia de aminoácidos de una ejemplar humano IgG1 cadena pesada región constante de la IgG1 G1m3 alotipo con alaninas que ocupan las posiciones 234 y 235 según la numeración EU.

30 [0128] SEQ ID NO: 103 establece la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada IgG1 humana ejemplar del alotipo G1m3 de IgG1.

[0129] SEQ ID NO: 104 establece la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera kappa humana ejemplar que tiene una terminal N arginina.

[0130] SEQ ID NO: 105 establece la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera kappa humana ejemplar sin una terminal N arginina.

5 [0131] SEQ ID NO: 106 se establece la secuencia de ácido nucleico de una región constante de cadena pesada ejemplar del alotipo de G1m3.

[0132] SEQ ID NO: 107 establece la secuencia de ácido nucleico de una región constante de cadena ligera ejemplar que tiene una terminal N arginina.

10 [0133] SEQ ID NO: 108 establece la secuencia de ácido nucleico de una región constante de cadena ligera ejemplar sin una terminal N arginina.

[0134] SEQ ID NO: 109 establece la secuencia de aminoácidos de transtiretina humano establecida en número de ingreso P02766.1 (UniProt).

[0135] SEQ ID NO: 110 establece la secuencia de aminoácidos de transtiretina humana establecida en número de ingreso AAB35639.1 (GenBank).

15 [0136] SEQ ID NO: 111 establece la secuencia de aminoácidos de transtiretina humana establecida en número de ingreso AAB35640.1 (GenBank).

[0137] SEQ ID NO: 112 establece la secuencia de aminoácidos de transtiretina humana establecida en número de ingreso ABI63351.1 (GenBank).

20 [0138] SEQ ID NO: 113 establece la secuencia de aminoácidos de residuos 89-97 de la transtiretina humana.

[0139] SEQ ID NO: 114 establece la secuencia de aminoácidos de un inmunógeno potencial de la transtiretina.

[0140] SEQ ID NO: 115 establece la secuencia de aminoácidos de un inmunógeno potencial de la transtiretina.

25 [0141] SEQ ID NO: 116 establece la secuencia de aminoácidos de un inmunógeno potencial de la transtiretina.

[0142] SEQ ID NO: 117 establece la secuencia de aminoácidos de la CDR-H1 de Chothia-Kabat compuesta del anticuerpo 9D5 de ratón.

30 [0143] SEQ ID NO: 118 establece la secuencia de aminoácidos del CDR-H1 de Chothia-Kabat compuesta del anticuerpo 14G8 de ratón.

## DEFINICIONES

[0144] El término "anticuerpo" incluye anticuerpos intactos y sus fragmentos de unión. Por lo general, los fragmentos compiten con el anticuerpo intacto del cual se derivaron para la unión específica del objetivo. Los fragmentos incluyen cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras separadas, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>c, Fv, anticuerpos de cadena simple y anticuerpos de dominio simple. El término "anticuerpo" incluye también un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares diferentes de cadena pesada/ligera y dos sitios de unión diferentes (ver, por ejemplo, Songvilai y Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol., 148:1547-53 (1992)).

[0145] La unidad estructural del anticuerpo básico es un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero se compone de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par tiene una cadena "ligera" (alrededor de 25 kDa) y una cadena "pesada" (alrededor de 50-70 kDa). La porción de terminal amino de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. Cuando se expresa inicialmente, esta región variable normalmente está ligada a una señal del péptido escindible. La región variable sin la señal del péptido se refiere a veces como una región variable madura. Así, por ejemplo, una región variable madura de cadena ligera significa una región variable de cadena ligera sin la señal del péptido de cadena ligera. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable para la función efectora. Una región constante puede incluir cualquiera o todas de una región CH<sub>1</sub>, región bisagra, región CH<sub>2</sub> y región CH<sub>3</sub>.

[0146] Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes se unen por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, con la cadena pesada que también incluye una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos. (Ver generalmente, Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989) Cap. 7) (incorporados en su totalidad por referencia para todos los efectos).

[0147] Las regiones variables maduras de cada par de cadenas ligera/pesada

forman el sitio de unión al anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Salvo por los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son iguales. Las cadenas presentan todas la misma estructura general de regiones de marco (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de dos las dos cadenas de cada par se alinean mediante las regiones de marco, que posibilitan la unión a un epítipo específico. Del extremo N al extremo C, tanto las cadenas ligera como pesada comprenden las regiones: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos para cada región es de acuerdo con las definiciones de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991), o Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342:878-883, 1989) o se pueden definir las CDR mediante las definiciones alternativas en la Tabla 1 más adelante. Kabat también proporciona una convención de numeración ampliamente utilizada (numeración de Kabat) en la cual se asignan los mismos números a residuos correspondientes entre diferentes cadenas pesadas o entre diferentes cadenas ligeras.

[0148] Tabla 1: Definiciones convencionales de CDR con la numeración de Kabat

Tabla 1

| Bucle | Kabat     | Chothia        | Compuesto de Chothia y Kabat | AbM       | Contacto  |
|-------|-----------|----------------|------------------------------|-----------|-----------|
| L1    | L24--L34  | L24--L34       | L24--L34                     | L24--L34  | L30--L36  |
| L2    | L50--L56  | L50--L56       | L50--L56                     | L50--L56  | L46--L55  |
| L3    | L89--L97  | L89--L97       | L89--L97                     | L89--L97  | L89--L96  |
| H1    | H31--H35B | H26--H32..H34* | H26--H35B*                   | H26--H35B | H30--H35B |
| H2    | H50--H65  | H52--H56       | H50--H65                     | H50--H58  | H47--H58  |
| H3    | H95--H102 | H95--H102      | H95--H102                    | H95--H102 | H93--H101 |

\* CDR-H1 por Chothia puede terminar en H32 y H33 H34 (dependiendo de la longitud del bucle). Esto es porque el esquema de numeración de Kabat coloca inserciones de residuos extras en 35A y 35B, mientras que la numeración Chothia los coloca en 31A y 31B. Si no hay H35A ni H35B (numeración Kabat), el bucle Chothia CDR-H1 termina en

H32. Si sólo H35A está presente, termina en H33. Si H35A y H35B están presentes, termina en H34.

[0149] La región variable madura de una cadena pesada o ligera se compara con la misma región de un anticuerpo de referencia, el porcentaje de identidad de secuencia entre el sujeto y las regiones de anticuerpo de referencia es la cantidad de posiciones ocupadas por el mismo aminoácido tanto en el sujeto como en la región de anticuerpo de referencia dividido por la cantidad total de posiciones alineadas de las dos regiones (sin contar espacios) multiplicado por 100 para convertir a porcentaje.

[0150] Con el fin de clasificar sustituciones de aminoácidos como conservadoras o no conservadoras, se agrupan los aminoácidos como a continuación: Grupo I (cadenas laterales hidrofóbicas): Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile; Grupo II (cadenas laterales hidrofílicas neutras): Cys, Ser, Thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): Asp, Glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): Asn, Gln, His, Lys, Arg; Grupo V (residuos que influyen en la orientación de la cadena): Gly, Pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): Trp, Tyr, Phe. Las sustituciones conservadoras implican sustituciones entre aminoácidos de la misma clase.

[0151] Las sustituciones no conservadoras constituyen un intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

[0152] Los anticuerpos de la invención se unen normalmente a su diana designada con una afinidad constante de al menos  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  o  $10^{10}$  M<sup>-1</sup>. Tal unión es una unión específica ya que tiene mayor magnitud detectable y se distingue de la unión no específica que se da con al menos una diana no relacionada. La unión específica puede ser el resultado de la formación de enlaces entre grupos funcionales particulares o ajuste espacial particular (por ejemplo, del tipo de llave y cerrojo), mientras que la unión no específica es usualmente el resultado de fuerzas de van der Waals. Sin embargo, la unión específica no necesariamente implica que un anticuerpo monoclonal se une solamente a una diana.

[0153] El término “síntoma” hace referencia a pruebas subjetivas de una enfermedad, tal como alteración de la marcha, tal como lo percibe un sujeto. Un “signo” hace referencia a pruebas objetivas de una enfermedad tal como lo observe un médico.

[0154] Un individuo tiene mayor riesgo de una enfermedad si el sujeto tiene al menos un factor de riesgo conocido (por ejemplo, genético, bioquímico, antecedentes familiares, exposición circunstancial) que coloque a los individuos con ese factor de riesgo en

un riesgo mayor estadísticamente significativo de desarrollar la enfermedad en comparación con individuos sin el factor de riesgo. "Significación estadística" significa  $p \leq 0,05$ .

[0155] A menos que resulte evidente a partir del contexto de otro modo, la expresión "alrededor de" abarca valores dentro de  $\pm 5$  o  $\pm 10$  % de un valor establecido.

5 [0156] A menos que resulte evidente a partir del contexto de otro modo, la referencia a un intervalo incluye cualquier entero dentro del intervalo.

[0157] El término "nativo" con respecto a la estructura transtiretina (TTR) se refiere a la estructura plegada normal de TTR en su estado de funcionamiento correcto (es decir, un tetrámero TTR). Conforme TTR es un tetrámero en su forma plegada nativamente, las formas  
10 no nativas de TTR incluyen, por ejemplo, tetrámeros TTR plegados erróneamente, monómeros TTR, formas agregadas de TTR y formas fibrílicas de TTR. Las formas no nativas de TTR pueden incluir moléculas que comprenden secuencias de aminoácidos TTR de tipo salvaje o mutaciones.

[0158] El término "mal plegada" con respecto a TTR se refiere a la estructura  
15 secundaria y terciaria de un monómero o multímero de polipéptido TTR, e indica que el polipéptido ha adoptado una conformación que no es normal para esa proteína en su estado de funcionamiento correcto. Aunque mal plegamiento de TTR puede ser causado por mutaciones en la proteína (por ejemplo, eliminación, sustitución o adición), proteínas de tipo salvaje TTR también pueden estar mal en enfermedades, exponer epítomos específicos.

20 [0159] El término "farmacéuticamente aceptable" significa que el portador, diluyente, excipiente o auxiliar es compatible con los demás ingredientes de la formulación y no sustancialmente perjudiciales al destinatario del mismo.

[0160] El término "paciente" incluye humanos y otros sujetos mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico.

25 [0161] Un individuo está en mayor riesgo de una enfermedad si el sujeto tiene al menos un factor de riesgo conocido (por ejemplo, genético, bioquímico, antecedentes familiares y exposición situacional) colocando a los individuos con ese factor de riesgo en un mayor riesgo estadísticamente significativo de desarrollar la enfermedad que los individuos sin el factor de riesgo.

30 [0162] El término "enfermedad" se refiere a cualquier condición anormal que deteriora la función fisiológica. El término se utiliza ampliamente para abarcar cualquier

trastorno, enfermedad, anomalía, patología, enfermedad, condición o síndrome en el cual se vea afectada la función fisiológica, independientemente de la naturaleza de la etiología.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

### 5 I. GENERAL

[0163] 14G8 y 9G5 son anticuerpos que se unen a la transtirretina (TTR). Las formas humanizadas de los anticuerpos se describen en WO2016/120810, que se incorpora en su totalidad a la presente mediante esta referencia, a todos los efectos. La presente solicitud proporciona formulaciones líquidas y liofilizadas que incorporan anticuerpos que tienen las CDR del anticuerpo 14G8 o 9G5, particularmente las formas quiméricas, chapeadas o humanizadas de 14G8 o 9G5. Las formulaciones incluyen combinaciones de excipientes farmacéuticamente aceptables que confieren estabilidad al anticuerpo tal como se describirá mejor más adelante.

### II. Moléculas objetivo

[0164] La transtirretina (TTR) es un suero de 55 kDa de 127 aminoácidos y una proteína de transporte de líquido cefalorraquídeo principalmente sintetizada por el hígado. También se ha denominado prealbúmina, prealbúmina de unión a tiroxina, ATTR y TBPA. En su estado nativo, TTR existe como un tetrámero. En los homocigotos, los tetrámeros comprenden subunidades idénticas de la hoja rica en beta de 127 aminoácidos. En los heterocigotos, los tetrámeros TTR se componen de subunidades variantes y/o de tipo salvaje, normalmente combinados de una manera estadística.

[0165] La función establecida de TTR en la sangre es transportar la proteína de unión al holo-retinol. Aunque la TTR es el principal portador de la tiroxina ( $T_4$ ) en la sangre de los roedores, utilizando sitios de unión que son ortogonales a los que se utilizan para la proteína de unión a retinol holo, los sitios de unión de  $T_4$  son efectivamente desocupados en los seres humanos.

[0166] La TTR es una de al menos treinta proteínas humanas diferentes cuyo mal plegamiento y/o desmontaje extracelular (amiloidogénesis) en un espectro de estructuras de agregados se cree que causa enfermedades degenerativas denominadas enfermedades amiloides. La TTR sufre cambios conformacionales para convertirse en amiloidogénico. El despliegue parcial expone tramos de residuos hidrofóbicos en gran parte no cargados en una conformación extendida que se desmontan eficientemente en agregados esféricos en gran

parte no estructurados que finalmente sufren conversión de conformación en estructuras amiloides de hoja cruzada beta.

[0167] A menos que aparezca otra cosa desde el contexto, la referencia a transtiretina (TTR) o sus fragmentos o dominios incluye las secuencias de aminoácidos naturales humanas incluyendo isoformas, mutantes y variantes alélicas de los mismos. Las secuencias de polipéptido TTR ejemplares se designan mediante los Números de Ingreso P02766.1 (UniProt), AAB35639.1 (GenBank), AAB35640.1 (GenBank) y ABI63351.1 (GenBank) (SEQ ID NOS: 109-112, respectivamente). Los residuos se numeran de acuerdo con Swiss Prot P02766.1, con el primer aminoácido de la proteína madura (es decir, sin incluir la secuencia señal de 20 aminoácidos) denominado residuo 1. En cualquier otra proteína TTR, los residuos están numerados según los residuos correspondientes en P02766.1 de alineación máxima.

### **III. Amiloidosis Transtiretina**

[0168] La amiloidosis de transtiretina (TTR) es un trastorno sistémico caracterizado por TTR patogénico, mal plegado y la deposición extracelular de fibrillas amiloides compuestas de TTR. La amiloidosis TTR es generalmente causada por la desestabilización de la forma tetramero nativa de TTR (debido a condiciones ambientales o genéticas), llevando a la disociación, mal plegado y agregación de TTR en fibrillas amiloides que se acumulan en diversos órganos y tejidos, causando disfunción progresiva. Ver, por ejemplo, Almeida and Saraiva, FEBS Letters 586:2891-2896 (2012); Ando et al., Orphanet Journal of Rare Diseases 8:31 (2013).

[0169] En humanos, los tetrameros TTR de tipo salvaje y los tetrameros mixtos compuestos por subunidades mutantes y de tipo salvaje pueden disociarse, mal plegarse y agregarse, con el proceso de amiloidogénesis que conduce a la degeneración del tejido post-mitótico. De este modo, las amiloidosis de TTR abarcan enfermedades causadas por TTR mal plegada patogénica resultante de mutaciones en TTR o resultantes de TTR no mutado y mal plegada.

[0170] Por ejemplo, la amiloidosis sistémica senil (SSA) y la amiloidosis cardíaca senil (SCA) son tipos de amiloidosis relacionadas con la edad que resultan de la deposición de amiloide TTR de tipo salvaje fuera y dentro de los cardiomiocitos del corazón. La amiloidosis TTR es también la forma más común de amiloidosis hereditaria (familiar), causada por mutaciones que desestabilizan la proteína TTR. Las amiloidosis TTR asociadas con mutaciones

puntuales en el gen TTR incluyen polineuropatía amiloide familiar (FAP), miocardiopatía amiloide familiar (FAC) y la rara amiloidosis selectiva del sistema nervioso central (CNSA). Los pacientes con amiloidosis TTR hereditaria (familiar) son casi siempre heterocigotos, lo que significa que los tetrámeros TTR están compuestos de subunidades TTR mutantes y/o de tipo salvaje, generalmente distribuidas estadísticamente. Las versiones hereditarias (familiares) de la amiloidosis TTR son generalmente autosómicas dominantes y suelen ser de inicio más temprano que las enfermedades esporádicas (SSA y SCA).

[0171] Hay más de 100 mutaciones en el gen que codifica TTR que han estado implicadas en los trastornos autosómicos dominantes FAP y FAC. Ver, por ejemplo, US 2014/0056904; Saraiva, Hum. Mutat. 17(6):493-503 (2001); Damas y Saraiva, J. Struct. Biol. 130:290-299; Dwulet y Benson, Biochem. Biophys. Res. Commun. 114:657-662 (1983). Estas mutaciones causantes de amiloide están distribuidas a lo largo de toda la molécula de TTR. Generalmente, cuanto más desestabilizantes son las subunidades mutantes para la estructura del tetrámero TTR, más temprano se inicia la enfermedad amiloide. El potencial patógeno de una variante de la TTR es generalmente determinado por una combinación de su inestabilidad y su eficiencia de secreción celular. La patología inicial causada por algunas variantes TTR viene de su destrucción selectiva del tejido cardíaco, mientras que a partir de otras variantes TTR viene de comprometer el sistema nervioso periférico y autónomo. El daño tisular causado por la amiloidogénesis TTR parece derivar en gran medida de la toxicidad de pequeños agregados TTR difusibles, aunque la acumulación de amiloide extracelular puede contribuir y casi ciertamente compromete la estructura del órgano en las últimas etapas de la amiloidosis TTR.

[0172] La amiloidosis TTR se presenta de muchas formas diferentes, con una considerable variación fenotípica entre individuos y localizaciones geográficas. Por ejemplo, la amiloidosis TTR puede presentarse como una neuropatía sensorial autonómica y motora progresiva, axonal. La amiloidosis TTR también puede presentarse como miocardiopatía infiltrativa.

[0173] La edad de inicio de los síntomas relacionados con la enfermedad varía entre la segunda y la novena década de vida, con grandes variaciones entre diferentes poblaciones. La implicación multisistémica de la amiloidosis TTR es una clave para su diagnóstico. Por ejemplo, el diagnóstico de amiloidosis TTR se considera cuando uno o varios

de los siguientes están presentes: (1) antecedentes familiares de enfermedad neuropática, especialmente asociada con insuficiencia cardíaca; (2) dolor neuropático o alteraciones sensoriales progresivas de etiología desconocida; (3) síndrome del túnel carpiano sin causa obvia, particularmente si es bilateral y requiere liberación quirúrgica; (4) trastornos de la motilidad gastrointestinal o disfunción del nervio autonómico de etiología desconocida (por ejemplo, disfunción eréctil, hipotensión ortostática, vejiga neurogénica); (5) enfermedad cardíaca caracterizada por paredes ventriculares espesas en ausencia de hipertensión; (6) bloqueo atrioventricular avanzado de origen desconocido, particularmente cuando está acompañado de un corazón engrosado; y (6) inclusiones del cuerpo vítreo del tipo algodón-lana. Ver Ando et al., *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013). Otros síntomas pueden incluir, por ejemplo, polineuropatía, pérdida sensorial, dolor, debilidad en miembros inferiores, dishidrosis, diarrea, estreñimiento, pérdida de peso e incontinencia/retención urinaria.

[0174] La neuropatía periférica se puede detectar y cuantificar mediante diversas escalas clínicas. Por ejemplo, Clinical Neuropathy Assessment (CNA, por su sigla en inglés), (Dyck PJ, Hughes RAC, O'Brien PC. Quantitating overall neuropathic symptoms, impairments and outcomes. En: Dyck PJ, Thomas PK, editores. *Peripheral neuropathy*. 4° ed. Filadelfia, PA: Elsevier Saunders; 2005. P 1031-51), proporciona una escala que comprende un puntaje de la función de los miembros inferiores (LLF, por su sigla en inglés), y la capacidad (puntuada 0) o incapacidad (puntuada 1) de caminar en los dedos de los pies, caminar sobre zapatos con taco y levantarse de una posición arrodillado; se puntúan los elementos por separado para cada lado. El puntaje de afectación por neuropatía (NIS, por su sigla en inglés) proporciona una evaluación clínica que evalúa la fuerza muscular, la actividad refleja y la sensación de los dedos de los pies y las manos. Para los sujetos con hATTR con neuropatía periférica, se puede evaluar la función neurológica en el transcurso del tiempo con NIS. NIS implica un análisis neurológico de los miembros inferiores, los miembros superiores y los pares craneales con un puntaje total de 244 (debilidad 192, sensación 32, reflejos 20). Los síntomas y cambios de la neuropatía (NSC, por su sigla en inglés) es un cuestionario de 38 puntos que evalúa la gravedad y el cambio de los síntomas (debilidad, sensibilidad, autonomía) de la neuropatía periférica con 3 escalas: cantidad de síntomas, gravedad de síntomas (leve=1, moderado=2, grave=3) que se puede utilizar para evaluar el cambio en el tiempo y una categoría de cambio (comparación de un síntoma con una referencia). Otras escalas son la fase de polineuropatía amiloidótica familiar

(FAP, por su sigla en inglés) y el puntaje de discapacidad en la polineuropatía (PND, por su sigla en inglés).

[0175] El diagnóstico de amiloidosis TTR se basa normalmente en biopsias de órganos objetivo, seguido de tinción histológica del tejido extirpado con el colorante específico de amiloide, rojo Congo. Si se observa una prueba positiva para amiloide, se realiza posteriormente tinción inmunohistoquímica para TTR para asegurar que la proteína precursora responsable de la formación de amiloide es realmente TTR. Para las formas familiares de las enfermedades, la demostración de una mutación en el gen que codifica TTR es entonces necesaria antes de que se pueda hacer el diagnóstico. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante electroforesis de enfoque isoeléctrico, reacción en cadena de la polimerasa o disección láser/cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem. Ver, por ejemplo, US 2014/0056904; Ruberg and Berk, *Circulation* 126:1286-1300 (2012); Ando et al., *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013).

#### IV. ANTICUERPOS

##### A. Especificidad de unión y propiedades funcionales

[0176] El anticuerpo 14G8 se aisló originalmente como un anticuerpo de ratón con una región variable de cadena pesada madura definida por la SEQ ID NO:61 y una región variable de cadena ligera madura definida por la SEQ ID NO: 70. CDRH1, H2 y H3 según Kabat tienen las SEQ ID NO:67-69 y CDRL1, L2 y L3 tienen las SEQ ID NO:77-79. Se proporciona un compuesto de Chothia-Kabat CDR-H1 como la SEQ ID NO: 118.

[0177] El anticuerpo 9G5 también se aisló originalmente como un anticuerpo de ratón con una región variable de cadena pesada madura definida por la SEQ ID NO:61 y una región variable de cadena ligera madura definida por la SEQ ID NO: 70. CDRH1, H2 y H3 según Kabat tienen las SEQ ID NO:13-15 y CDRL1, L2 y L3 según Kabat tienen las SEQ ID NO:24-26. Las CDR según Kabat de 9G5 son las mismas que las de 14G8 salvo por que en las posiciones 9G5, H52 y L26 según la numeración de Kabat están ocupadas por N y en 9G5 por S. Se proporciona una CDR-H1 compuesta según Chothia-Kabat como la SEQ ID NO:117.

[0178] Se pueden definir alternativamente las CDR mediante cualquiera de las siguientes convenciones antemencionadas.

[0179] Las formulaciones de la invención incluyen un anticuerpo que comprende

una cadena pesada madura que comprende las CDR H1, H2 y H3 de 14G8 y las CDR L1, L2 y L3 de 14G8 salvo por que cada una de las posiciones H52 y L26 según la numeración de Kabat puede ser independientemente N o S. Algunos anticuerpos incluyen las CDR H1, H2 y H3 de 14G8 y las CDR L1, L2 y L3 de 14G8 en donde las posiciones H52 y L26 están ambas ocupadas por N. Algunos anticuerpos incluyen una cadena pesada madura que comprende las CDR H1, H2, H3 de 9G5 y una cadena ligera madura que comprende las CDR L1, L2 y L3 de 9G5, en donde las posiciones H52 y L26 son S.

[0180] A menos que resulte evidente de otro modo a partir del contexto la referencia a 14G8 o 9G5 debe entenderse como referencia a cualquiera de las formas de ratón, quimérica, chapeada y humanizada del anticuerpo de ratón. Estos anticuerpos se unen específicamente dentro de aproximadamente los residuos de aminoácidos 89-97 (SEQ ID NO: 113) de TTR. Tales epítomos están enterrados en el tetrámero TTR nativo y expuestos en formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrillas de TTR.

[0181] Otros anticuerpos pueden obtenerse mediante mutagénesis del ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo ejemplar, como 14G8 o 9G5. Lo anticuerpos monoclonales que son al menos el 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a 14G8 en secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadenas pesada y/o ligera maduras y mantener sus propiedades funcionales, y/o que difieren del anticuerpo respectivo por un pequeño número de sustituciones de aminoácidos funcionalmente insignificantes (por ejemplo, sustituciones conservativas), deleciones o inserciones también se incluyen en la invención.

[0182] Los anticuerpos que incluyen las CDR de 14G8 o 9G5 como se describieron en general anteriormente se caracterizan por su capacidad de unirse a formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o de fibrillas de TTR, preferentemente respecto a formas tetraméricas nativas de TTR. Además, estos anticuerpos se caracterizan por su inmunorreactividad preferencial sobre el tejido cardíaco amiloideo mediado por TTR, pero no sobre tejido cardíaco sano. La unión o inmunorreactividad preferencial puede ser relativa, por ejemplo, al menos 2 veces mejor o absoluta (es decir, sin unión o inmunorreactividad a TTR natural, o tejido cardíaco sano).

[0183] Algunos anticuerpos pueden inhibir o reducir la agregación de TTR, inhibir o reducir la formación de fibrillas TTR, reducir o eliminar depósitos de TTR o TTR agregado o

estabilizan conformaciones no tóxicas de TTR en un modelo animal o ensayo clínico. Algunos anticuerpos pueden tratar, efectuar profilaxis de o retrasar la aparición de una amiloidosis TTR como se muestra en un modelo animal o ensayo clínico. Los modelos animales ejemplares para las pruebas de actividad contra una amiloidosis TTR incluyen los descritos en Kohno et al., Am. J. Path. 150(4):1497-1508 (1997); Teng et al., Laboratory Investigations 81:385-396 (2001); Wakasugi et al., Proc. Japan Acad. 63B:344-347 (1987); Shimada et al., Mol. Biol. Med. 6:333-343 (1989); Nagata et al., J. Biochem. 117:169-175 (1995); Sousa et al., Am. J. Path. 161:1935-1948 (2002); and Santos et al., Neurobiology of Aging 31:280-289 (2010).

#### B. Anticuerpos Humanizados

10            [0184]        Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo genéticamente modificado en el que las CDR de un anticuerpo donador no humano se injertan en secuencias de anticuerpo aceptor humano (ver, por ejemplo, Queen, US 5,530,101 and 5,585,089; Winter, US 5,225,539; Carter, US 6,407,213; Adair, US 5,859,205; y Foote, US 6,881,557). Las secuencias de anticuerpos del aceptor pueden ser, por ejemplo, una secuencia de anticuerpo humano madura, 15 un compuesto de tales secuencias, una secuencia de consenso de secuencias de anticuerpos humanos o una secuencia de la región de la línea germinal. Por lo tanto, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo tiene al menos tres, cuatro, cinco o todas las CDR entera o substancialmente de un anticuerpo de donador y secuencias de estructura de regiones variables y regiones constantes, si están presentes, entera o sustancialmente a partir de secuencias de anticuerpos humanos. De forma similar, una cadena pesada humanizada tiene al menos una, 20 dos y usualmente todas las tres CDR entera o sustancialmente de una cadena pesada de anticuerpo donador, y una secuencia de estructura de región variable de cadena pesada y región constante de cadena pesada, si está presente, sustancialmente de estructura de región variable de cadena pesada humana y secuencias de regiones constantes. Asimismo, una 25 cadena ligera humanizada tiene al menos uno, dos y generalmente todas las tres CDR entera o sustancialmente de una cadena ligera del anticuerpo donador y una secuencia de estructura de región variable de cadena ligera y la estructura de la región constante de cadenas ligeras, si están presentes, sustancialmente de marco de región variable de cadena ligera humana y la región constante de las secuencias. Aparte de los nanocuerpos y dAbs, un anticuerpo 30 humanizado comprende una cadena pesada humanizada y una cadena ligera humanizada. Una CDR en un anticuerpo humanizado es sustancialmente de una CDR correspondiente en un

anticuerpo no humano cuando al menos 85%, 90%, 95% o 100% de residuos correspondientes (como se define en cualquier definición convencional, tal como, por ejemplo, definida por Kabat) son idénticos entre las respectivas CDR. Las secuencias estructurales de región variable de una cadena de anticuerpo o la región constante de una cadena de anticuerpos son sustancialmente de una secuencia estructural de región variable humana o región constante humana respectivamente cuando al menos 85%, 90%, 95% o 100% de residuos correspondientes definidos por cualquier definición convencional, tal como, por ejemplo, definida por Kabat son idénticas.

[0185] Aunque los anticuerpos humanizados a menudo incorporan las seis CDR (definidas por cualquier definición convencional, tal como, por ejemplo, como se define por Kabat) de un anticuerpo de ratón, también pueden hacerse con menos de todas las CDR (por ejemplo, al menos 3, 4, o 5 CDR) de un anticuerpo de ratón (por ejemplo, Pascalis et al., J. Immunol. 169:3076, 2002; Vajdos et al., J. de Mol. Biol, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36:1079-1091, 1999; Tamura et al., J. Immunol., 164:1432-1441, 2000).

[0186] En algunos anticuerpos sólo se necesita una parte de las CDR, es decir, el subconjunto de residuos CDR requeridos para la unión, denominados SDR, son necesarios para retener la unión en un anticuerpo humanizado. Los residuos de CDR que no entran en contacto con el antígeno y no en los SDR pueden ser identificados con base en estudios previos (por ejemplo, los residuos H60-H65 en CDR H2 a menudo no son requeridos), de regiones de CDR de Kabat situadas fuera de los bucles hipotransparentes de Chothia (Chothia, J. Mol. Biol. 196:901, 1987), por modelado molecular y/o empírica, o como se describe en Gonzales et al., Mol. Immunol. 41: 863, 2004. En tales anticuerpos humanizados en posiciones en las que está ausente uno o más residuos de CDR donador o en los que se omite una CDR de donador entera, el aminoácido que ocupa la posición puede ser un aminoácido que ocupa la posición correspondiente (por numeración de Kabat) en la secuencia de anticuerpos del aceptor. El número de tales sustituciones de aceptor para aminoácidos donador en las CDRs para incluir refleja un equilibrio de consideraciones competitivas. Tales sustituciones son potencialmente ventajosas para disminuir el número de aminoácidos de ratón en un anticuerpo humanizado y, por consiguiente, disminuir la posible inmunogenicidad. Sin embargo, las sustituciones también pueden causar cambios de afinidad, y preferiblemente se evitan reducciones considerables en la afinidad. Las posiciones de sustitución dentro de las CDR y aminoácidos para sustituir

también se pueden seleccionar empíricamente.

[0187] Las secuencias de anticuerpos del aceptor humanos pueden seleccionarse opcionalmente de entre las muchas secuencias de anticuerpos humanos conocidas para proporcionar un alto grado de identidad de secuencia (por ejemplo, 65-85% de identidad) entre un marco de región variable de secuencia de aceptor humano y estructuras de regiones variables correspondientes de un donador de cadena de anticuerpos.

[0188] Ejemplos de secuencias de aceptor para la cadena pesada son las regiones variables de cadenas pesadas maduras humanas con códigos de acceso NCBI BACO2114 y AAX82494.1 (SEQ ID NO: 3 y 4) y regiones variables de cadena pesada del Kabat humano, subgrupo 3. BACO2114 comparte la misma forma canónica como cadena pesada 9D5 de ratón. Otros ejemplos de secuencias de aceptor de la cadena pesada son las regiones variables de cadena pesada madura humana con NCBI códigos de ingreso AAD30410.1 y AAX82494.1 (SEQ ID NO: 63 y 4, respectivamente) y regiones variables de cadena pesada del Kabat humano, subgrupo 1. AAD30410.1 y AAX82494.1 incluyen dos CDR con la misma forma canónica como cadena pesada 14G8 de ratón. Ejemplos de secuencias de aceptor de la cadena ligera son la región variable de cadena ligera madura humana con código de ingreso NCBI ABC66952 (SEQ ID NO: 18) y regiones variables de la cadena ligera del Kabat humano, subgrupo 3. ABC66952 incluye dos CDR con la misma forma canónica como la cadena ligera 9D5 de ratón. Otros ejemplos de secuencias de aceptor de la cadena ligera son las regiones variables de la cadena ligera madura humana con códigos NCBI de acceso ABA71374.1 y ABC66952.1 (SEQ ID NO: 72 y 73, respectivamente) y regiones variables cadena del Kabat humano, subgrupo 2. ABA71374.1 y ABC66952.1 tienen la misma forma canónica como la cadena ligera 14G8 de ratón.

[0189] Si se selecciona más de una secuencia de anticuerpo aceptor humano, se puede usar un compuesto o híbrido de esos del aceptor y los aminoácidos usados en diferentes posiciones en la cadena ligera humanizada y en las regiones variables de cadena pesada pueden tomarse de cualesquiera de las secuencias de anticuerpos del aceptor humanos utilizados. Por ejemplo, las regiones variables de cadena pesada madura humana con códigos NCBI de ingreso BACO2114 y AAX82494.1 (SEQ ID NO: 3 y 4) fueron utilizados como secuencias de aceptor para humanización de la región variable de cadena pesada madura 9D5. Ejemplos de las posiciones en que estos dos del aceptor difieren incluyen las posiciones

H19 (R o K), H40 (A o T), H44 (G o R), H49 (S o A), H77 (S o T), H82a (N o S), H83 (R o K), H84 (A o S) y H89 (V o M). Las versiones humanizadas de la región variable de cadena pesada 9D5 pueden incluir cualesquier de los aminoácidos en cualquiera de estas posiciones. Del mismo modo, las regiones variables de cadena pesada madura humana con códigos NCBI de ingreso AAD30410.1 y AAX82494.1 (SEQ ID NO: 63 y 4, respectivamente) fueron utilizados como secuencias aceptadoras para la humanización de la región variable de cadena pesada madura 14G8. Ejemplos de las posiciones en que estos dos del aceptor difieren incluyen las posiciones H82a (N o S), H83 (R o K), H84 (A o S) y H89 (V o M). Las versiones humanizadas de la región variable de cadena pesada 14G 8 pueden incluir cualesquier de los aminoácidos en cualquiera de estas posiciones. Del mismo modo, la región variable de cadena ligera madura humana con códigos NCBI de acceso ABA71374.1 y ABC66952.1 (SEQ ID NO: 72 y 73, respectivamente) fueron utilizados como secuencias de aceptor para la humanización de la región variable de cadena ligera madura 14G 8. Un ejemplo de una posición en la cual difieren estos dos del aceptor es la posición L18 (S o P). Las versiones humanizadas de la región variable de cadena ligera 14G8 pueden incluir cualesquier de los aminoácidos en esta posición.

[0190] Ciertos aminoácidos de los residuos estructurales de la región variable humana pueden seleccionarse para la sustitución con base en su posible influencia en la conformación de las CDR y/o la unión al antígeno. La investigación de tales posibles influencias es modelando, examinando las características de los aminoácidos en localizaciones particulares, u observando empíricamente los efectos de la sustitución o mutagénesis de aminoácidos particulares.

[0191] Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un residuo estructural de región variable murina madura y un residuo estructural de región variable humana madura seleccionado, el aminoácido estructural humano puede estar sustituido por el aminoácido estructural equivalente del anticuerpo de ratón cuando se espera razonablemente que el aminoácido ácido:

- (1) se une no covalentemente al antígeno de manera directa,
- (2) es adyacente a una región de CDR,
- (3) de otro modo interactúa con una región CDR (por ejemplo está dentro de aproximadamente 6 Å de una región CDR),
- (4) media la interacción entre las cadenas pesada y ligera.

[0192] Los residuos estructurales de las clases (1) a (3) según se define por Queen, US 5,530,101, se denominan a veces alternativamente residuos canónicos y vernier. Los residuos estructurales que ayudan a definir la conformación de un bucle de CDR se denominan a veces residuos canónicos (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Thornton y Martin, J. Mol. Biol. 263:800815 (1996)). Los residuos estructurales que soportan las conformaciones de bucle de unión al antígeno y juegan un papel en el ajuste fino del ajuste de un anticuerpo al antígeno se denominan a veces residuos de vernier (Foote & Winter, J. Mol. Biol. 224:487-499 (1992)).

[0193] Otros residuos estructurales que son candidatos para sustitución son residuos que crean un sitio potencial de glicosilación. Sin embargo, otros candidatos para la sustitución son los aminoácidos del aceptor de la estructura humana que son inusuales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden ser sustituidos con los aminoácidos de posición equivalente del anticuerpo del ratón donador o de las posiciones equivalentes de las inmunoglobulinas humanas más típicas.

[0194] Por razones tales como la posible influencia sobre la conformación de CDR y/o la unión al antígeno, la interacción mediadora entre las cadenas pesada y ligera, la interacción con la región constante, siendo un sitio para la modificación postraduccional deseada o indeseada, siendo un residuo inusual para su posición en una secuencia de región variable humana y, por tanto, potencialmente inmunogénica, obteniendo el potencial de agregación, y otras razones, se consideraron las siguientes 15 posiciones estructurales de región variable se consideraron como candidatas para sustituciones en las ocho regiones variables de cadena pesada madura Hu9D5 ejemplificadas y las cinco regiones variables de cadena ligera madura Hu9D5 ejemplificadas, tal como se especifica además en los ejemplos: H42 (G42E), H47 (W47L), H69 (I69F), H82 (M82S), H82b (S82(b)L), H108 (T108L), L8 (P8A), L9 (L9P), L18 (P18S), L19 (A19V), L36 (Y36F), L39 (K39R), L60 (D60S), L70 (D70A) y L74 (K74R). Asimismo, las siguientes 11 posiciones estructurales de regiones variables como candidatos para sustituciones en las tres regiones variables de cadenas pesadas maduras Hu14G8 ejemplificadas y las tres regiones variables de cadenas ligeras maduras Hu14G8, como se especifica adicionalmente en los ejemplos: H1 (Q1E), H3 (Q3K), H47 (W47L), H105 (Q105T), L8 (P8A), L9 (L9P), L19 (A19V), L26 (N26S), L36 (Y36F), L60 (D60S) y L70 (D70A).

[0195] Aquí, como en otras partes, el residuo mencionado en primer lugar es el

residuo de un anticuerpo humanizado formado por injerto de CDR de Kabat o una CDR de compuesto Chothia-Kabat en el caso de CDR-H1 en una estructura de aceptor humano (por ejemplo, una estructura de aceptor humano compuesta o híbrida) y el segundo residuo mencionado es un residuo que se considera para reemplazar dicho residuo. Así, dentro de las

5 estructuras de la región variable, el primer residuo mencionado es humano, y dentro de las CDR, el primer residuo mencionado es ratón.

[0196] Los anticuerpos Hu9D5 ejemplificados incluyen cualquier permutación o combinación de las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras maduras ejemplificadas (por ejemplo, VHvl/VLvl o H1L1, VHvi/VLv2 o H1L2, VHvi/VLv3 o H1L3, VHvi/VLv4 o H1L4,

10 VHvi/VLv5 o H1L5, VHv2/VLvl o H2L1, VHv2/VLv2 o H2L2, VHv2/VLv3 o H2L3, VHv2/VLv4 o H2L4, VHv2/VLv5 o H2L5, VHv2b/VLvi o H2bL1, VHv2b/VLv2 o H2bL2, VHv2b/VLv3 o H2bL3, VHv2b/VLv4 o H2bL4, VHv2b/VLv5 o H2bL5, VHv3/VLvl o H3L1, VHv3/VLv2 o H3L2, VHv3/VLv3 o H3L3, VHv3/VLv4 o H3L4, VHv3/VLv5 o H3L5, VHv3b/NLvl o H3bL1, VHv3b/VLv2 o H3bL2, VHv3b/VLv3 o H3bL3, VHv3b/VLv4 o H3bL4, VHv3b/VLv5 o H3bL5, VHv4/VLvl o

15 H4L1, VHv4/VLv2 o H4L2, VHv4/VLv3 o H4L3, VHv4/VLv4 o H4L4, VHv4/VLv5 o H4L5, VHv4b/VLvl o H4bL1, VHv4b/VLv2 o H4bL2, VHv4b/VLv3 o H4bL3, VHv4b/VLv4 o H4bL4, VHv4b/VLv5 o H4bL5, VHv5/VLvi o H5L1, VHv5/VLv2 o H5L2, VHv5/VLv3 o H5L3, VHv5/VLv4 o H5L4 y VHv5/VLv5 o H5L5).

[0197] La invención proporciona formulaciones de variantes de anticuerpos 9D5

20 humanizado en los cuales la región variable de cadena pesada humanizada madura muestra al menos el 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad a un Hu9D5VHv4b humanizado (SEQ ID NO: 11) y la región variable de cadena ligera humanizada madura muestra al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad a un Hu9D5VLv1 (SEQ ID NO: 19). En algunos de estos anticuerpos, se retienen al menos 1, 2 o todas las 3 de las retromutaciones u otras

25 mutaciones en Hu9D5 H4bL1. La invención también proporciona variantes de los otros anticuerpos 9D5 humanizado ejemplificado. Dichos variantes tienen regiones variables de cadenas ligera y pesada maduras que muestran al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las regiones variables de cadenas ligera y pesada maduras de las regiones de anticuerpos humanizados ejemplificados 9D5 H1L1, H1L2, H1L3, H1L4, H1L5,

30 H2L1, H2L2, H2L3, H2L4, H2L5, H2bL1, H2bL2, H2bL3, H2bL4, H2bL5, H3L1, H3L2, H3L3, H3L4, H3L5, H3bL1, H3bL2, H3bL3, H3bL4, H3bL5, H4L1, H4L2, H4L3, H4L4, H4L5, H4bL1,

H4bL2, H4bL3, H4bL4, H4bL5, H5L1, H5L2, H5L3, H5L4, o H5L5.

[0198] Las posiciones estructurales de las regiones variables son según la numeración Kabat, a menos que se indique lo contrario. Otras variantes de este tipo difieren normalmente de las secuencias de las cadenas pesadas y ligeras de Hu9D5 ejemplificadas por un número pequeño (por ejemplo, normalmente no más de 1, 2, 3, 5, 10 ó 15) de sustituciones, 5 deleciones o inserciones. Tales diferencias están generalmente en la estructura, pero también pueden ocurrir en las CDRs.

[0199] Los anticuerpos Hu14G8 ejemplificados incluyen cualquier permutación o combinación de las regiones variables de cadenas pesada y ligera maduras ejemplificadas (por ejemplo, VHv1/VLv1 o H1L1, VHv1/VLv2 o H1L2, VHv1/VLv3 o H1L3, VHv2NLv1 o H2L1, VHv2/VLv2 o H2L2, VHv2/VLv3 o H2L3, VHv3/VLv1 o H3L1, VHv3/VLv2 o H3L2 y VHv3/VLv3 o H3L3).

[0200] La invención proporciona formulaciones de variantes de anticuerpos 14G8 humanizados en los que la región variable de la cadena pesada humanizada madura muestra al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con Hu14G8VHv2 (Hu14G8H2) (SEQ ID NO: 65) y la región variable de cadena ligera humanizada madura muestra al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad Hu14G8VLv3 (Hu14G8 L3) (SEQ ID NO: 76). En algunos de los anticuerpos, por lo menos 1, 2, 3, 4 o todas las 5 de las retromutaciones o de otras mutaciones en Hu14G8 H2L3 se conservan. La invención también proporciona variantes de los otros anticuerpos 14G8 humanizados ejemplificados. Estas variantes tienen regiones variables de cadena ligera y pesada maduras mostrando al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de la secuencia de las regiones variables de cadenas ligera y pesadas maduras de anticuerpos humanizados ejemplificados 14G8 H1L1, H1L2, H1L3, H2L1, H2L2, H2L3, H3L1, H3L2 o H3L3.

[0201] En algunos anticuerpos, por lo menos una de las posiciones H1 y H47 en la región Vh está ocupada por E y L, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones H1 y H47 en la región Vh están ocupadas por E y L, respectivamente, como en Hu14G8VHv2 y Hu14G8VHv3. En algunos anticuerpos, por lo menos una de las posiciones H3 y H105 en la región Vh está ocupada por K y T, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones H3 y H105 en la región Vh están ocupadas por K y T, respectivamente, como en Hu14G8VHv1. En

algunos anticuerpos, la posición L36 en la región Vk es ocupada por F, como en Hu14G8VLv2. En algunos anticuerpos, por lo menos una de las posiciones L8, L9, L19, L26, L60 y L70 en la región Vk está ocupada por A, P, V, S, S y A, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones L8, L9, L19 y L70 en la región Vk están ocupadas por A, P, V y A, respectivamente, como en Hu14G8VLv1. En algunos anticuerpos, las posiciones L26 y L60 en la región de Vk están cada una ocupadas por S, como en Hu14G8VLv3. Las regiones CDRs de tales anticuerpos humanizados pueden ser idénticos o substancialmente idénticas a las regiones CDRs de anticuerpos 14G8 de ratón donador. Las regiones CDRs pueden ser definidas por cualquier definición convencional (por ejemplo, Chothia, o compuesto de Chothia y Kabat), por ejemplo, definidas por Kabat.

[0202] Las posiciones estructurales de las regiones variables son según la numeración Kabat, a menos que se indique lo contrario. Otras variantes de este tipo difieren normalmente de las secuencias de las cadenas pesada y ligera de Hu14G8 ejemplificadas por un número pequeño (por ejemplo, normalmente no más de 1, 2, 3, 5, 10 ó 15) de sustituciones, deleciones o inserciones. Tales diferencias están generalmente en la estructura, pero también pueden ocurrir en las CDRs.

[0203] Una posibilidad de variación adicional en las variantes 14G8 o 9G5 humanizadas es la retro-mutación adicional en las estructuras de la región variable. Muchos de los residuos estructurales que no están en contacto con las CDRs en el mAb humanizado pueden acomodar sustituciones de aminoácidos de las posiciones correspondientes del mAb de ratón donador u otros anticuerpos de ratón o humanos e incluso muchos residuos potenciales de contacto con CDR también son susceptibles a sustitución. Incluso los aminoácidos dentro de las CDRs pueden estar alterados, por ejemplo, con residuos que se encuentran en la posición correspondiente de la secuencia de aceptor humano usado para suministrar estructuras de región variable. Además, se pueden usar secuencias de aceptor humano alternativas, por ejemplo, para la cadena pesada y/o ligera. Si se utilizan diferentes secuencias de aceptor, puede que no se realice una o más de las retromutaciones recomendadas anteriormente debido a que los residuos de donador y aceptor correspondientes ya son los mismos sin retromutación.

[0204] Preferiblemente, las sustituciones o las retromutaciones las variantes 14G8 o 9G5 humanizadas (conservadoras o no) no tienen un efecto perjudicial sustancial sobre la

afinidad de unión o potencia del mAb humanizado, es decir, su capacidad para unirse a TTR monomérico (por ejemplo, la potencia en algunos o todos los ensayos descritos en los presentes ejemplos del anticuerpo 14G8 o 9G5 humanizado son esencialmente los mismos o al menos 90 % de, es decir, dentro del error experimental, como el del anticuerpo 14G8 o 9G5 murino).

5

### C. Selección de la región constante

[0205] Las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos humanizados pueden unirse con al menos una parte de una región constante humana. La elección de una región constante depende, en parte, de si se desea una citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos, una fagocitosis celular dependiente de anticuerpos y/o una citotoxicidad dependiente del complemento. Por ejemplo, los isótopos humanos IgG1 e IgG3 tienen citotoxicidad dependiente del complemento y los isotipos humanos IgG2 e IgG4 no. Las IgG1 e IgG3 humanas también inducen funciones efectoras mediadas por células más fuertes que las IgG2 e IgG4 humanas. Las regiones constantes de la cadena ligera pueden ser lambda o kappa.

[0206] Uno o varios aminoácidos en el extremo amino o carboxi de la cadena ligera y/o pesada, tal como la lisina terminal C de la cadena pesada, pueden faltar o derivatizarse en una proporción o en todas las moléculas. Se pueden hacer sustituciones en las regiones constantes para reducir o aumentar la función efectora tal como citotoxicidad mediada por el complemento o ADCC (ver, por ejemplo, Winter et al., Patente de EE.UU. No. 5,624,821, Tso et al., Patente de EE.UU. No. 5,834,597; Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 103:4005, 2006), o para prolongar la vida media en humanos (ver, por ejemplo, Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004). Las sustituciones ejemplares incluyen un Gln en la posición 250 y/o un Leu en la posición 428 (la numeración EU se usa en este párrafo para la región constante) para aumentar la vida media de un anticuerpo. La sustitución en cualquiera o en todas las posiciones 234, 235, 236 y/o 237 reduce la afinidad por los receptores Fcy, en particular el receptor FcyRI (ver, por ejemplo, US 6,624,821). Una sustitución de alanina en las posiciones 234, 235 y 237 de la IgG1 humana puede utilizarse para reducir funciones efectoras. Algunos anticuerpos tienen sustitución de alanina en posición 234, 235 y 237 de la IgG1 humana para reducir funciones efectoras. Opcionalmente, las posiciones 234, 236 y 237 de IgG2 humano son sustituidas con alanina y la posición 235 con glutamina (ver, por ejemplo, US 5,624,821). En

algunos anticuerpos, una mutación en una o más de las posiciones 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329 y 331 por la numeración EU de IgG1 humana se utiliza. En algunos anticuerpos, una mutación en una o más de las posiciones 318, 320 y 322 por numeración EU de IgG1 humana se utiliza. En algunos anticuerpos, las posiciones 234 o 235 son sustituidas con alanina y/o la posición 329 se sustituye con glicina. En algunos anticuerpos, las posiciones 234 y 235 se sustituyen con alanina, como en la SEQ ID NO: 102. En algunos anticuerpos del isotipo es IgG2 o IgG4 humano.

[0207] Una región constante kappa de cadena ligera humana ejemplar tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104. La arginina de terminal N de la SEQ ID NO: 104 se puede omitir, en cuyo caso la región constante kappa de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 105. Los anticuerpos pueden expresarse como tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, como cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras, como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv, o como anticuerpos de cadena sencilla en los que los dominios variables de cadena pesada y ligera madura están unidos a través de un espaciador.

[0208] Las regiones constantes humanas muestran variación alotípica y variación isoalotípica entre diferentes individuos, es decir, las regiones constantes pueden diferir en diferentes individuos en una o más posiciones polimórficas. Los isoalotipos difieren de los alotipos en que los sueros que reconocen un isoalotipo se unen a una región no polimórfica de uno o más isotipos. La referencia a una región constante humana incluye una región constante con cualquier alotipo natural o cualquier permutación de residuos que ocupan posiciones en alotipos naturales. Se prefieren las secuencias de cadena pesada ilustrativas que incluyen aquellas que tienen las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO:101-103 con la SEQ ID NO:103, que es del alotipo IgG1 G1m3. La referencia a una región constante humana incluye una región constante con cualquier alotipo natural o cualquier permutación de residuos que ocupan las posiciones en alotipos naturales.

#### D. Expresión de Anticuerpos Recombinantes

[0209] Los anticuerpos se pueden producir mediante expresión recombinante. Los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos se pueden optimizar por codones para su expresión en el tipo celular deseado (por ejemplo, CHO o Sp2/0). Las construcciones de ácido

nucleico recombinante incluyen normalmente una secuencia de control de expresión unida operativamente a las secuencias codificantes de cadenas de anticuerpos, incluyendo regiones promotoras asociadas o heterólogas. Las secuencias de control de expresión pueden ser sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucariotas. Una vez que el vector se ha incorporado al huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos y la recolección y purificación de los anticuerpos de reacción cruzada. El vector o vectores que codifican las cadenas de anticuerpos pueden contener un gen seleccionable, tal como dihidrofolato reductasa, para permitir la amplificación de la cantidad de copias de los ácidos nucleicos que codifican las cadenas de anticuerpos.

[0210] El *E. coli* es un huésped procariótico particularmente útil para expresar anticuerpos, particularmente fragmentos de anticuerpos. Los microbios, tales como la levadura, también son útiles para la expresión. La *Saccharomyces* es un huésped preferido de levadura, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de expresión, un origen de replicación, secuencias de terminación y similares como se desee. Los promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glicolíticas. Los promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, promotores de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C y enzimas responsables de las utilizaciones de maltosa y galactosa.

[0211] Las células de mamífero pueden usarse para expresar segmentos de nucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de los mismos. Ver Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987). Se han desarrollado en la técnica varias líneas de células huésped adecuadas capaces de segregar proteínas heterólogas intactas, e incluyen líneas celulares CHO, diversas líneas celulares COS, células HeLa, células HEK293, células L y mielomas que no producen anticuerpos, incluyendo Sp2/0 y NS0. Puede ser ventajoso usar células no humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986)), y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias de terminación transcripcional. Las secuencias de control de expresión adecuadas son promotores derivados de genes endógenos, citomegalovirus, SV40, adenovirus, papilomavirus bovino, y similares. Ver Co et al., J. Immunol. 148:1149 (1992).

[0212] Habiendo introducido vector(es) que codifican cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo en el cultivo celular, las agrupaciones de células pueden ser cribadas para determinar la productividad del crecimiento y la calidad del producto en medios libres de suero. Las principales productoras de agrupaciones de células pueden estar sujetas a continuación de la clonación de una célula basada en FACS para generar líneas monoclonales. Pueden ser ventajosas productividades específicas por encima de 50 pg o 100 pg por célula al día, que corresponden a títulos de producto de más de 7,5 g/l de cultivo. Los anticuerpos producidos por clones de células individuales también pueden ensayarse en cuanto a turbidez, propiedades de filtración, PAGE, IEF, barrido UV, HP-SEC, mapeo de carbohidratos-oligosacáridos, espectrometría de masas y ensayo de unión, tales como ELISA o Biacore. Un clon seleccionado puede entonces ser depositado en múltiples viales y almacenado congelado para uso posterior.

[0213] La metodología para la producción comercial de anticuerpos incluye la optimización de codones, la selección de promotores, elementos de transcripción y terminadores, la clonación de célula única libre de suero, depósito de célula, el uso de marcadores de selección para la amplificación del número de copias, terminador CHO, clonación de células individuales sin suero, mejora de los títulos de proteína (ver, por ejemplo, US5,786,464, US 6,114,148, US 6,063,598, US 7,569,339, WO2004/050884, WO2008/012142, WO2008/012142, WO2005/019442, WO2008/107388, and WO2009/027471; y US 5,888,809).

[0214] Una vez expresados, los anticuerpos se pueden purificar de acuerdo con procedimientos habituales de la técnica, incluso captura de proteína A, cromatografía en columna (por ejemplo, interacción hidrofóbica o intercambio iónico), pH bajo para inactivación viral y similares (véase, en general, Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982)).

[0215] Los anticuerpos que se utilizan para preparar las formulaciones descritas normalmente se aíslan o purifican, es decir, carecen básicamente de material celular u otras proteínas contaminantes de las células en las cuales se producen, o carecen básicamente de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetizan en forma química. Por ejemplo, un anticuerpo que carece básicamente de material celular incluye preparaciones del anticuerpo con menos que alrededor de 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 8 %, 5 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % o menos (en peso seco) de proteína contaminante. Cuando un anticuerpo se produce en forma recombinante, carece básicamente de medio de cultivo de modo que el medio de cultivo representa menos que alrededor de 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 8 %, 5 %, 2 %, 1 %, 0,5 %,

0,1 %, o menos, del volumen de la preparación de proteínas. Cuando se produce un anticuerpo por síntesis química, preferentemente carece básicamente o está separado de precursores químicos u otros químicos implicados en la síntesis de la proteína. Por consiguiente, tales preparaciones de anticuerpos tienen menos que alrededor de 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 8 %, 5 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, o menos (en peso seco) de precursores químicos o compuestos que no sean la sustancia farmacéutica de anticuerpo. El anticuerpo expresado en forma recombinante se puede purificar mediante métodos tales como, por ejemplo, cromatografía por afinidad, tratamiento ácido, filtración de profundidad, cromatografía de intercambio de aniones, cromatografía de intercambio de cationes, nanofiltración, ultrafiltración, diálisis y diafiltración.

[0216] La sustancia farmacéutica de anticuerpo purificada puede ajustarse a una solución que comprende cualquiera de las formulaciones descritas en la presente, diluida a la concentración deseada y almacenada hasta que esté lista para su uso. Opcionalmente, la formulación se puede almacenar en forma concentrada hasta que esté lista para su uso.

#### E. Conjugados

[0217] Los anticuerpos utilizados en las formulaciones descritas pueden acoplarse con un resto terapéutico, tal como una sustancia citotóxica, un radioterápico, un inmunomodulador, un segundo anticuerpo (por ejemplo, para formar un heteroconjugado de anticuerpo) o cualquier otra sustancia biológicamente activa que facilite o mejore la actividad de un 14G8 o 9G5 quimérico, chapeado o humanizado. Los restos terapéuticos representativos incluyen fármacos que reducen los niveles de TTR, estabilizan la estructura tetramérica de TTR nativa, inhiben la agregación de TTR, alteran la formación de fibrillas TTR o amiloide, o contrarrestan la toxicidad celular.

[0218] Los anticuerpos divulgados en el presente documento también pueden acoplarse o conjugarse con uno o más de otros anticuerpos (por ejemplo, para formar heteroconjugados de anticuerpos). Tales otros anticuerpos pueden unirse a diferentes epítomos dentro de TTR o una porción de los mismos o pueden unirse a un antígeno objetivo diferente.

[0219] Los anticuerpos también se pueden acoplar con un marcador detectable. Tales anticuerpos se pueden utilizar, por ejemplo, para diagnosticar una amiloidosis TTR, para monitorear la progresión de una amiloidosis TTR y/o para evaluar la eficacia del tratamiento.

Tales anticuerpos son particularmente útiles para llevar a cabo tales determinaciones en sujetos que tienen o son susceptibles a una amiloidosis TTR, o en muestras biológicas apropiadas obtenidas a partir de dichos sujetos. Los marcadores detectables representativos que pueden estar acoplados o unidos a un anticuerpo incluyen varias enzimas, tales como peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos protésicos, tales como estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como luminol; materiales bioluminiscentes, tales como luciferasa, luciferina y aequorina; materiales radioactivos, tales como itrio<sup>90</sup> (90Y), plata radiactiva-111, plata radiactiva-199, Bismuto<sup>213</sup>, yodo (<sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>121</sup>I), carbono (<sup>14</sup>C), azufre (<sup>35</sup>S), tritio (<sup>3</sup>-H), indio (<sup>115</sup>In, <sup>113</sup>In, <sup>112</sup>In, <sup>111</sup>In), tecnecio (<sup>99</sup>Tc), talio (<sup>201</sup>Tl), galio (<sup>68</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga), paladio (<sup>103</sup>Pd), molibdeno (<sup>99</sup>Mo), xenón (<sup>133</sup>Xe), flúor (<sup>18</sup>F), <sup>153</sup>Sm, <sup>177</sup>Lu, <sup>159</sup>Gd, <sup>149</sup>Pm, <sup>140</sup>La, <sup>175</sup>Yb, <sup>166</sup>Ho, <sup>90</sup>Y, <sup>47</sup>Sc, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>142</sup>Pr, <sup>105</sup>Rn, <sup>97</sup>Ru, <sup>68</sup>Ge, <sup>57</sup>Co, <sup>65</sup>Zn, <sup>85</sup>Sr, <sup>32</sup>P, <sup>153</sup>Gd, <sup>169</sup>Yb, <sup>51</sup>Cr, <sup>54</sup>Mn, <sup>75</sup>Se, <sup>113</sup>Sn y <sup>117</sup>Tin; metales emisores de positrones utilizando diversas tomografías por emisión de positrones; iones metálicos paramagnéticos no radiactivos; y moléculas que están radiomarcadas o conjugadas a radioisótopos específicos.

[0220] La unión de los radioisótopos a los anticuerpos puede realizarse con quelatos de bifunción convencionales. Para la unión de plata radiactiva-111 y plata radiactiva-199, se pueden usar uniones basadas en azufre. Ver Hazra et al., Cell Biophys. 24-25: 1-7 (1994). La unión de los radioisótopos de plata puede implicar la reducción de la inmunoglobulina con ácido ascórbico. Para los radioisótopos tales como 111In y 90Y, se puede usar ibritumomab tiuxetan y reaccionará con dichos isótopos para formar 111In-ibritumomab tiuxetan y 90Y-ibritumomab tiuxetan, respectivamente. Ver Witzig, Cancer Chemother. Pharmacol., 48 Suppl 1: S91-S95 (2001).

[0221] Fracciones terapéuticas, otras proteínas, otros anticuerpos o etiquetas detectables pueden ser junto o conjugadas, directa o indirectamente a través de un intermediario (por ejemplo, vinculador), a un anticuerpo de la invención. Ver por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Los anticuerpos para administración de fármacos," en el suministro de

medicamentos controlados (2do Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A review, "in Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985); and Thorpe et al., Immunol. Rev., 62:119-58 (1982). Los vinculadores adecuados incluyen, por ejemplo, vinculadores divisibles o no divisibles. Pueden emplearse diferentes vinculadores que liberan las fracciones terapéuticas acopladas, proteínas, anticuerpos y/o etiquetas detectables en condiciones ácidas o de reducción, sobre la exposición a las proteasas específicas, o bajo otras condiciones definidas.

## V. Formulaciones

[0222] Las formulaciones (que también se conocen como composiciones farmacéuticas) de la invención comprenden cualquiera de los anticuerpos monoclonales descritos en la presente solicitud incluso versiones quiméricas, chapeadas o humanizadas del anticuerpo 14G8 o 9G5, un amortiguador, uno o más azúcares y/o polioles y un tensioactivo, y tienen un pH dentro del intervalo de alrededor de 4,5 a alrededor de 7,5. Otros componentes (aparte del agua en formulaciones líquidas), tal como, por ejemplo, arginina, lisina, NaCl, sorbitol o manitol pueden estar presentes o no. Las formulaciones pueden ser en forma líquida o liofilizada. Las formulaciones líquidas pueden hacer referencia a una formulación antes de la liofilización o después de la reconstitución de una formulación liofilizada. En general, los componentes de una formulación aparte del agua se dan en las mismas proporciones relativas en peso o moles en una formulación liofilizada como en una formulación líquida antes de la liofilización. Asimismo, los componentes de la formulación luego de la reconstitución con agua se encuentran en general en las mismas proporciones relativas que en la formulación preliofilizada o en la formulación liofilizada pero las concentraciones absolutas pueden cambiar en proporción respecto a los volúmenes relativos de la formulación pre y posreconstitución. El volumen posreconstitución puede ser el mismo, menos o más que el volumen preliofilización. Normalmente el volumen posreconstitución es el mismo dentro de un factor de 5, 3, 2, 1,5, 1,2 o 1,1 del volumen preliofilización. Si por ejemplo, el volumen posreconstitución es dos veces el volumen preliofilización, las concentraciones de componentes son aproximadamente la mitad

de esa posreconstitución como preliofilización.

[0223] En formulaciones líquidas, el anticuerpo puede presentarse a una concentración dentro de un intervalo de alrededor de 10-100, 15-80, 20-65, 25-75, 40-65, 45-65 mg/mL, entre otros. En algunas formulaciones, el anticuerpo se encuentra presente a 55-65 mg/ml preliofilización y 45-55 mg/ml luego de la reconstitución. En algunas formulaciones, el anticuerpo se encuentra presente a 50 mg/ml luego de la reconstitución.

[0224] Las formulaciones incluyen un amortiguador, tal como, por ejemplo, citrato, histidina, fosfato o succinato, para conferir un intervalo de pH de alrededor de 4,5 a alrededor de 7,5, por ejemplo, un pH de 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 o 7,0. Algunas formulaciones tienen un pH de entre alrededor de 5,5 y alrededor de 7,0, o alrededor de 5,5 y alrededor de 6,5, o alrededor de 5,5 y alrededor de 6,0, o alrededor de 6,0 y alrededor de 6,5, o alrededor de 6,0 y alrededor de 7,0, o alrededor de 5,75-6,25. Algunas formulaciones tienen un pH de alrededor de 6,0 y algunas formulaciones tienen un pH de alrededor de 6,5. En algunas formulaciones, hay histidina presente a una concentración dentro de un intervalo de alrededor de 10-30 mM, o 15-25 mM, por ejemplo a una concentración de alrededor de 10 mM, 20 mM o 25 mM. En algunas formulaciones, hay citrato presente a una concentración dentro de un intervalo de alrededor de 10-30 mM, por ejemplo, a una concentración de alrededor de 10 mM o 20 mM. En algunas formulaciones, hay fosfato presente a una concentración de alrededor de 20 mM. En algunas formulaciones, hay succinato presente a una concentración de alrededor de 20 mM.

[0225] Las formulaciones incluyen un azúcar/poliol, tal como, por ejemplo, trehalosa o sacarosa. El azúcar/poliol puede estar presente de alrededor de 30 mM a alrededor de 260 mM, o alrededor de 150-350 mM, o alrededor de 200-300 mM, o alrededor de 220-260 mM, o alrededor de 230-250 mM, o alrededor de 205-240 mM, o alrededor de 205-250 mM o alrededor de 205-260 mM, o alrededor de 230-250 mM, o alrededor de 230-240 mM, o alrededor de 30 mM, alrededor de 205 mM o alrededor de 240 mM. En algunas formulaciones, hay trehalosa presente a una concentración dentro de un intervalo de alrededor de 205-260 mM, alrededor de 205-250 mM, o alrededor de 205-240 mM, tal como, por ejemplo, alrededor de 205 mM, alrededor de 230 mM o alrededor de 240 mM. En algunas formulaciones, hay sacarosa presente a una concentración dentro de un intervalo de alrededor de 30-260 mM, alrededor de 30-250 mM o alrededor de 30-240 mM, tal como, por ejemplo, alrededor de 30 mM, alrededor

de 230 mM o alrededor de 240 mM.

[0226] Las formulaciones incluyen un tensioactivo tal como, por ejemplo, polisorbato 20 (PS20), polisorbato 80 (PS80) o un poloxámero, por ejemplo, poloxámero 188 (también conocido como PX188, PLURONIC F68 o FLOCOR). El tensioactivo puede estar  
5 presente a una concentración dentro del intervalo de alrededor de 0,01 %-0,1 %, 0,02 %-0,04 % o 0,03 %-0,05 % en peso. Por ejemplo, la concentración puede ser 0,005 %, 0,01 %, 0,015 %, 0,02 %, 0,025 %, 0,03 %, 0,035 %, 0,04 %, 0,045 % o 0,05 % en peso. Los poloxámeros son copolímeros en tribloques no iónicos compuestos de una cadena hidrofóbica central de polioxipropileno (óxido de poli(propileno)) flanqueado por dos cadenas hidrofílicas de  
10 polioxietileno (óxido de poli(etileno)). Algunas formulaciones incluyen alrededor de 0,02 % p/p de PS20, alrededor de 0,02 % p/p de PS80 o alrededor de 0,04 % poloxámero, por ejemplo, 0,04 % de poloxámero PX188 en peso.

[0227] Algunas de tales formulaciones se caracterizan por una osmolalidad en el intervalo de alrededor de 270 mOsm/kg a alrededor de 330 mOsm/kg, tal como, por ejemplo,  
15 alrededor de 335 mOsm/kg.

[0228] Una formulación ilustrativa caracterizada por un pH dentro del intervalo de alrededor de 5,0 a alrededor de 6,5 incluye (a) una versión quimérica, chapeada o humanizada del anticuerpo 14G8 que comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende tres CDR de SEQ ID NO:61 y una región variable de cadena ligera madura que  
20 comprende tres CDR de SEQ ID NO:70, salvo por que las posiciones H52 y/o L26 según la numeración de Kabat pueden ser N o S, o una versión quimérica, chapeada o humanizada del anticuerpo anti-TTR 9G5 que comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende tres CDR de SEQ ID NO:1 y una región variable de cadena ligera madura que comprende tres CDR de SEQ ID NO:16, en donde el anticuerpo se encuentra presente a una  
25 concentración dentro del intervalo de alrededor de 25 mg/mL a alrededor de 75 mg/mL; (b) histidina, citrato, fosfato o succinato presente a una concentración de alrededor de 20 mM; (c) sacarosa o trehalosa presente a una concentración dentro del intervalo de alrededor de 295 mM a alrededor de 240 mM o si el azúcar se encuentra ausente hay presente 160 mM de arginina; y (d) un tensioactivo presente a una concentración dentro del intervalo de alrededor  
30 de 0,01 % a alrededor de 0,1 % en peso; siempre que (i) si hay presente amortiguador de histidina o succinato, el pH es de alrededor de 6,0, (ii) si hay presente amortiguador de fosfato,

el pH es de alrededor de 6,5, y si están presentes histidina y trehalosa el tensioactivo es PS80 o PS20, siempre que si hay PS20 presente, también haya presente 25 mM de L-arginina.

[0229] Algunas formulaciones básicamente carecen de manitol o sorbitol o tanto manitol como sorbitol. En algunas formulaciones, el amortiguador comprende histidina, tal como, por ejemplo, un amortiguador de histidina. En algunas de tales formulaciones, el azúcar puede estar presente en un intervalo de alrededor de 230 mM a alrededor de 240 mM. En algunas formulaciones, el azúcar es sacarosa y el tensioactivo es PS20 o PX188, por ejemplo PS20 a una concentración de 0,02 % p/p o PX188 a una concentración de 0,04 % p/p. En otras formulaciones, el azúcar es trehalosa. En algunas formulaciones hay 160mM de arginina presente. El amortiguador de algunas formulaciones puede ser citrato. En algunas de tales formulaciones, el azúcar se encuentra presente a 230mM. En algunas de tales formulaciones el tensioactivo es PS20 al 0,02 %. De manera alternativa, el amortiguador puede ser fosfato. En algunas de tales formulaciones, hay presente sacarosa. En otras formulaciones, el amortiguador es succinato. En algunas de tales formulaciones hay presente sacarosa. En algunas formulaciones que comprenden histidina, hay trehalosa presente, por ejemplo a una concentración de 205 mM.

[0230] Las formulaciones ilustrativas incluyen alrededor de (a) 20 mM de citrato, 230 mM de trehalosa y 0,02 % p/p de PS20 a pH5; (b) 20 mM de histidina, 230 mM de sacarosa y 0,02 % p/p de PS20; (c) 20 mM de fosfato, 230 mM de sacarosa y 0,02 % p/p PS20 a pH 6,5; (d) 20 mM de citrato, 230 mM de sacarosa y 0,02 % p/p de PS20 a pH 6,5; (e) 20 mM de histidina, 230 mM de trehalosa y 0,02 % p/p de PS80; (f) 20 mM de histidina, 0,02 % p/p de PS20 y 160 mM de L-arginina; (g) 20 mM de histidina, 240 mM de sacarosa y 0,04 % p/p de PX188; (h) 20 mM de succinato, 240 mM de sacarosa y 0,022 % p/p de PS20 a un pH de 6,0 y (i) 20 mM de histidina, 205 mM de trehalosa, 0,02 % p/p de PS20 y 25 mM de L-arginina. Algunas de tales formulaciones consisten básicamente en el anticuerpo y (a) 20 mM de citrato, 230 mM de trehalosa y 0,02 % p/p de PS20 a pH5; (b) 20 mM de histidina, 230 mM de sacarosa y 0,02 % p/p de PS20; (c) 20 mM de fosfato, 230 mM de sacarosa y 0,02 % p/p PS20 a pH 6,5; (d) 20 mM de citrato, 230 mM de sacarosa y 0,02 % p/p de PS20 a pH 6,5; (e) 20 mM de histidina, 230 mM de trehalosa y 0,02 % p/p de PS80; (f) 20 mM de histidina, 0,02 % p/p de PS20 y 160 mM de L-arginina; (g) 20 mM de histidina, 240 mM de sacarosa y 0,04 % p/p de PX188; (h) 20 mM de succinato, 240 mM de sacarosa y 0,022 % p/p de PS20 a un pH de 6,0 o

(i) 20 mM de histidina, 205 mM de trehalosa, 0,02 % p/p de PS20 y 25 mM de L-arginina. Por ejemplo, la formulación puede consistir básicamente en el anticuerpo y alrededor de (a) 20 mM de histidina, 240 mM de sacarosa y PX188 al 0,04 % p/p; (b) 20 mM de succinato, 240 mM de sacarosa y PS20 al 0,02 % p/p a un pH de 6,0; o (c) 20 mM de histidina, 205 mM de trehalosa, PS20 al 0,02 % p/p y 25 mM de L-arginina.

[0231] Por ejemplo, la formulación puede incluir (a) un anticuerpo que comprende una cadena ligera madura que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece como SEQ ID NO:65 y una cadena pesada madura que comprende una secuencia de aminoácidos que se establece como SEQ ID NO:76, que se encuentra presente a una concentración de alrededor de 45-65 mg/mL; (b) un amortiguador de histidina a una concentración de alrededor de 15-25 mM; (c) sacarosa a una concentración de alrededor de 220-260 mM; (d) poloxámero a una concentración de alrededor de 0,03-0,05 %; y un pH de alrededor de 5,75-6,25. La formulación puede incluir (a) un anticuerpo que comprende una cadena ligera madura que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece como SEQ ID NO:65 y una cadena pesada madura que comprende una secuencia de aminoácidos que se establece como SEQ ID NO:76, que se encuentra presente a una concentración de alrededor de 45-65 mg/mL; (b) un amortiguador de histidina a una concentración de alrededor de 20 mM; (c) sacarosa a una concentración de alrededor de 240 mM; (d) poloxámero a una concentración de alrededor de 0,04 %; y un pH de alrededor de 6. Por ejemplo, la formulación puede consistir básicamente en un anticuerpo que comprende una cadena ligera madura que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece como SEQ ID NO:65 y una cadena pesada madura que comprende una secuencia de aminoácidos que se establece como SEQ ID NO:76, y alrededor de 20 mM de histidina, alrededor de 240 mM de sacarosa y alrededor de 0,04 % p/p de PX188.

[0232] Las formulaciones liofilizadas incluyen cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente, (b) un amortiguador, tal como histidina; (c) un azúcar/poliol tal como sacarosa; y (d) un tensioactivo, tal como un poloxámero. En algunas formulaciones liofilizadas, cualquier agua residual constituye menos que 5 % en peso y en algunas de tales formulaciones menos que 2 o 1 % en peso de la formulación. Las cantidades de componentes dependen del volumen liofilizado pero puede ser por ejemplo alrededor de 100-300, 150-250 o 225-275 mg de anticuerpo, alrededor de 15-35 o 15-19 mg de amortiguador, y alrededor de 0,2 - 2,5 o 2,0-2,5 mg de tensioactivo y alrededor de 400-490 mg de azúcar o polioli. Una formulación

liofilizada ilustrativa incluye 225-275 mg de un anticuerpo 14G8 humanizado, alrededor de 15-19 mg de L-histidina, alrededor de 400-490 mg de sacarosa y alrededor de 2,0-2,5 mg de poloxámero, o los mismos componentes presentes en las mismas proporciones pero en diferentes cantidades. Se pueden preparar formulaciones liofilizadas a partir de cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en la presente. Una de tales formulaciones liofilizadas consiste básicamente en alrededor de 250 mg de un anticuerpo 14G8 humanizado, alrededor de 16,8 mg de L-histidina, alrededor de 2,2 mg de poloxámero PX188 y alrededor de 445,3 mg de sacarosa o diferentes cantidades de los mismos componentes en las mismas proporciones. Las formulaciones liofilizadas se pueden almacenar congeladas (por ejemplo, -20 °C), en frío (por ejemplo, 4 °C) o a temperatura ambiente (por ejemplo, 22 °C). Un tamaño de frasco ilustrativo para una formulación liofilizada es 20 ml.

[0233] Las formulaciones liofilizadas pueden reconstituirse al combinarse con un líquido adecuado, por ejemplo, agua estéril. Las formulaciones liofilizadas se pueden reconstituir con agua estéril en una solución sin particulado a simple vista en menos que 5, 4, 3, 2 minutos. Se puede medir la reconstitución con respecto al mismo volumen (+/-20 %) como aquella de la formulación líquida antes de la liofilización. La reconstitución a un volumen final deseado, por ejemplo, alrededor de 5 ml, se puede lograr mediante la adición de una cantidad determinada de líquido teniendo en cuenta el volumen ocupado por los componentes secos. Por ejemplo, algunas formulaciones liofilizadas se pueden reconstituir a un volumen total de alrededor de 5 ml mediante la adición de alrededor de 4,9 ml de agua estéril. La reconstitución puede producir que los componentes tengan aproximadamente las mismas concentraciones, relativas y absolutas, que antes de la liofilización o pueden producir aproximadamente las mismas concentraciones relativas que antes de la liofilización pero disminución o aumento de las concentraciones absolutas. Algunas formulaciones liofilizadas se constituyen en un volumen de alrededor de 1,2 veces el volumen de la formulación preliofilizada que produce una disminución de las concentraciones de alrededor de 17 %. Algunas formulaciones reconstituidas incluyen una concentración de anticuerpo de alrededor de 40-60 mg/mL, por ejemplo, alrededor de 50 mg/mL; (b) un amortiguador de histidina presente a una concentración de alrededor de 15-25 mM, por ejemplo, alrededor de 20 mM; (c) sacarosa presente a una concentración de alrededor de 200-300 mM, por ejemplo, alrededor de 240 mM; (d) poloxámero presente a una concentración de alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,1 % en peso, por

ejemplo, alrededor de 0,04 % en peso; y (e) un pH de alrededor de 5,5-6,5, por ejemplo, alrededor de 6,0.

[0234] Las formulaciones liofilizadas líquidas o reconstituidas pueden ser considerablemente isotónicas lo que implica una osmolalidad de alrededor de 250-350 mOsm/kg de agua. Algunas formulaciones tienen una osmolalidad de alrededor de 335 mOsm/kg. Algunas formulaciones tienen una osmolalidad de 270-300 mOsm/kg. Las formulaciones líquidas o liofilizadas reconstituidas también pueden ser hipertónicas > 350 mOsm/kg de agua o hipotónicas (<250 mOsm/kg de agua).

[0235] Las formulaciones líquidas (normalmente luego de la reconstitución) se pueden agregar a una bolsa para infusión que contiene un diluyente tal como solución salina normal o solución de Ringer antes de la administración al paciente. El volumen de la bolsa para infusión es en general relativamente grande (por ejemplo, 50 ml a 1 L, o 100-500 ml) en comparación con el volumen de la formulación líquida o la formulación liofilizada constituida (por ejemplo, 1-10 ml). Se pueden usar varios líquidos en la bolsa para infusión, tal como solución salina normal, solución de Ringer lactada o solución de dextrosa al 5 %, cada una de las cuales es considerablemente isotónica. En un esquema ilustrativo alrededor de 5 ml de la formulación liofilizada reconstituida o líquida se inyecta a través del puerto de una bolsa de 100-ml de solución salina normal y se administra mediante infusión IV durante un período de tiempo de alrededor de una hora a una velocidad de flujo de alrededor de 1,75 ml/min.

[0236] Las formulaciones previstas para administración a humanos se fabrican preferentemente según prácticas óptimas de fabricación (GMP, por su sigla en inglés) aprobadas o que puedan ser aprobadas por la FDA o un organismo regulador para otro país que no sea los Estados Unidos, por ejemplo, la Agencia Europea de Medicamentos, para la preparación de fármacos para su administración a humanos. Normalmente, las formulaciones son estériles, por ejemplo, tal como se logra mediante filtración estéril con un filtro de 0,2 µm o uno de 0,22 µm.

[0237] La estabilidad de la formulación se puede evaluar luego del almacenamiento en la forma liofilizada mediante reconstitución. Las formulaciones ilustrativas son estables a 38 °C-42 °C (por ejemplo, tal como se evalúa mediante cromatografía por exclusión de tamaño de alto rendimiento (HPSEC)) luego del almacenamiento en forma liofilizada durante al menos alrededor de 30 días, formulaciones que tienen estabilidad a 20 °C-

24 °C luego del almacenamiento durante al menos alrededor de 1 año y formulaciones que tienen estabilidad a 2 °C-4 °C luego del almacenamiento durante al menos alrededor de 3 años. Una formulación se considera estable si, luego de la incubación en una o más de estas combinaciones especificadas de tiempo y temperatura, coincide con la definición que obra más

5 adelante de la fragmentación baja a no detectable y/o agregación baja a no detectable. Más particularmente, las formulaciones descritas presentan niveles bajos a no detectables de agregación y/o fragmentación de anticuerpos, o un aumento bajo o no detectable de fragmentación y/o agregación de anticuerpos sobre un nivel inicial (por ejemplo, menos de alrededor de 10 % de agregación). Algunas formulaciones presentan  $\leq$  alrededor de 5 % de

10 agregación y/o fragmentación combinadas. Una formulación que tiene niveles de bajos a no detectables de fragmentación contiene al menos alrededor de 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de la proteína total, por ejemplo, en un único pico tal como se determine mediante cromatografía por exclusión de tamaño de alto rendimiento (HPSEC), o en dos picos (uno correspondiente a cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo y las cadenas ligeras del

15 anticuerpo) mediante menor electroforesis capilar en gel (rCGE, por su sigla en inglés), que representa el anticuerpo no degradado, y que no contiene otros picos individuales que tengan más que 5 %, más que 4 %, más que 3 %, más que 2 %, más que 1 % o más que 0,5 % del total de proteína cada uno. Una formulación con niveles bajos a no detectables de agregación contiene no más de alrededor de 15 %, no más de alrededor de 10 %, no más de alrededor de

20 5 %, no más de alrededor de 4 %, no más de alrededor de 3 %, no más de alrededor de 2 %, no más de alrededor de 1 % o no más de alrededor de 0,5 % de agregación en peso de proteína, según se midió mediante cromatografía por exclusión de tamaño de alto rendimiento (HPSEC). Por ejemplo, en algunas formulaciones, menos que alrededor de 10 % del anticuerpo antisinucleína se encuentra presente como un agregado. Las formulaciones estables de la

25 invención también presentan poca pérdida de actividades biológicas de anticuerpo o ninguna, por ejemplo, con afinidad de unión, cuantificable mediante ELISA y/u otros ensayos funcionales, es decir, al menos alrededor de 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de un valor inicial cuantificable. Algunas formulaciones tienen una afinidad de unión que es de alrededor de 60 % a alrededor de 140 % de un valor cuantificable inicial del

30 material de referencia.

## VI. Métodos de tratamiento

[0238] Las formulaciones de la invención se pueden usar para tratar o llevar a cabo la profilaxis de una enfermedad en un paciente que padezca o tenga riesgo de padecer la enfermedad mediada al menos en parte por la transtirretina (TTR), y particularmente por formas monoméricas, con errores de plegamiento, agregadas o en forma de fibrillas de la TTR. En algunos métodos de tratamiento, el paciente fue diagnosticado con amiloidosis ATTR. Algunos de tales pacientes pueden tener afectación cardíaca por ATTR y/o afectación por neuropatía periférica. Algunos pacientes tienen miocardiopatía ATTR sin mutaciones en la cual las proteínas TRR “naturales” se agrupan y forman depósitos amiloides. Algunos pacientes tienen miocardiopatía ATTR hereditaria. Algunos pacientes tienen polineuropatía hereditaria.

[0239] Las formulaciones se administran en un régimen eficaz que significa una dosificación, vía de administración y frecuencia de administración que retrasa la aparición, reduce la gravedad, inhibe el deterioro adicional y/o alivia al menos un signo o síntoma de un trastorno que se está tratando. Si un paciente ya está sufriendo de un trastorno, el régimen puede ser denominado como un régimen terapéutico eficaz. Si el paciente está en alto riesgo de contraer la enfermedad en relación con la población general, pero aún no está experimentando los síntomas, el régimen puede ser denominado un régimen profiláctico eficaz. En algunos casos, la eficacia terapéutica o profiláctica puede observarse en un paciente individual en comparación con controles históricos o la experiencia en el mismo paciente. En otros casos, la eficacia terapéutica o profiláctica puede demostrarse en un ensayo preclínico o clínico en una población de pacientes tratados en relación con una población control de pacientes no tratados.

[0240] La frecuencia de administración depende de la vida media del anticuerpo en la circulación, la condición del paciente y la vía de administración entre otros factores. La frecuencia puede ser diaria, semanal, mensual, trimestral o a intervalos irregulares en respuesta a cambios en la condición del paciente o el progreso del trastorno a tratar. Una frecuencia ejemplar para la administración intravenosa es entre semanal y trimestral sobre una causa continua de tratamiento, por ejemplo, una vez cada cuatro semanas, aunque también es posible una dosificación más o menos frecuente. Para la administración subcutánea, una frecuencia de dosificación ejemplar es de diaria a mensual, aunque también es posible una dosificación más o menos frecuente.

[0241] El número de dosis administradas depende de si el trastorno es agudo o crónico y de la respuesta del trastorno al tratamiento. Para trastornos agudos o exacerbaciones agudas de un trastorno crónico, entre 1 y 10 dosis son a menudo suficientes. A veces, una sola dosis en bolo, opcionalmente en forma dividida, es suficiente para un trastorno agudo o exacerbación aguda de un trastorno crónico. El tratamiento puede repetirse para la recurrencia de un trastorno agudo o exacerbación aguda. Para los trastornos crónicos, un anticuerpo puede ser administrado a intervalos regulares, por ejemplo, semanal, quincenal, mensual, trimestralmente, semestral por lo menos 3 meses, 12 meses, 5 años o 10 años, o de por vida del paciente.

[0242] Un régimen se considera terapéutica o profilácticamente eficaz si un paciente tratado individualmente logra un resultado más favorable que el resultado promedio en una población de control de pacientes comparables no tratados por métodos de la invención, o si se demuestra un resultado más favorable en pacientes tratados frente a los pacientes de control en un ensayo clínico controlado (por ejemplo, un ensayo fase II, fase II/III o fase III) en el nivel  $p < 0,05$  o  $0,01$  o incluso  $0,001$ .

[0243] Las dosis eficaces varían dependiendo de muchos factores diferentes, tales como medios de administración, sitio objetivo, estado fisiológico del sujeto, si el sujeto es humano o animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico.

[0244] Un rango de dosis ejemplar para anticuerpos puede ser de aproximadamente de 0,1 a 80 mg/kg, 0,1-30, de 0,5 a 5, o 1-10 mg/kg de peso corporal (por ejemplo, 0,1, 0,2, 0,3, 1,0, 3,0, 10,0 o 30,0mg/kg) o 10-5000, por ejemplo, 10-1500 mg como dosis fija. Algunos métodos aumentan la dosis con el tiempo. La dosis puede aumentarse en incrementos de uno (es decir, un cambio de dosis), dos, tres o más. Puede haber 1, 2, 3 o más dosis en cada nivel antes del nivel final. El nivel de dosis final puede continuarse durante, por ejemplo, al menos 15 dosis. Por ejemplo, una dosis inicial puede encontrarse en el intervalo de 0,1 mg/kg a 3 mg/kg para tres infusiones una vez cada 28 días, luego tres infusiones a un nivel intermedio también cada 28 días, seguido de dosis a un nivel mayor, por ejemplo de 10-30 mg/kg cada 38 horas, opcionalmente al menos 15 veces. La dosificación depende de la afección del paciente y respuesta al tratamiento previo, si los hubiere, si el tratamiento es profiláctico o terapéutico y si el trastorno es agudo o crónico, entre otros factores.

[0245] Las formulaciones pueden administrarse por una vía periférica. Las vías de administración incluyen tópica, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, intranasal o intramuscular. Por ejemplo, las vías para la administración de las formulaciones que se proporcionan en la presente pueden ser intravenosa o subcutánea. La administración intravenosa puede ser, por ejemplo, por infusión durante un periodo en un intervalo de 30-180 minutos, tal como 30 a 90 minutos, 60-120 minutos o 90-180 minutos. Este tipo de inyección se realiza más normalmente en el brazo o en los músculos de las piernas. En algunos de tales métodos, el paciente puede premedicarse con un analgésico o un antihistamínico o difenhidramina. Por ejemplo, se puede administrar difenhidramina al paciente dentro de un intervalo de alrededor de 30 a 90 minutos antes de la administración de anticuerpo. Se puede premedicar a algunos pacientes con paracetamol dentro de un intervalo de alrededor de 30 a 90 minutos antes de la administración del anticuerpo. En algunos métodos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular donde los depósitos se han acumulado, por ejemplo, inyección intracraneal.

[0246] Las formulaciones líquidas se pueden administrar directamente al paciente, por ejemplo, mediante inyección subcutánea o mediante infusión. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyen en un líquido, por ejemplo, agua estéril antes de la administración al paciente. Para infusión, la formulación líquida se introduce en una bolsa de líquido isotónico, por ejemplo, solución salina normal. Por ejemplo, una forma de dosificación liofilizada de la formulación se puede reconstituir a un volumen de alrededor de 5,0 mL con agua estéril, y diluida en solución salina normal para infusión, por ejemplo, para un volumen de infusión total de 100 mL, 250 mL o 500 mL.

[0247] Los regímenes que comprenden los anticuerpos formulados en la presente se pueden administrar combinados con otros tratamientos a un sujeto que padezca o tenga riesgo de padecer una amiloidosis mediada por transtirretina. Opcionalmente, además de administrar el anticuerpo formulado en la presente, tales tratamientos se administran en forma consecutiva o por separado a un sujeto que lo necesite. Opcionalmente, el sujeto ya no recibe el tratamiento con la formulación farmacéutica que comprende los anticuerpos formulados.

[0248] Estos tratamientos incluyen estabilizadores de TTR, tal como tafamidis y diflunisal, genoterapias para suprimir la expresión de TTR y la posterior producción de proteínas TTR incluso el uso de ARN interferentes pequeños, tal como patisirán e inotersén, y

oligonucleótidos de antisentido, así como degradadores amiloides incluso 4'-yodo-4'-desoxidoxorrubicina (IDOX), doxiciclina, ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) y ciclodextrina (CyD) y anticuerpos anti-SAP.

[0249] Los estabilizadores de TTR, tal como tafamidis (Vyndaquel de Pfizer) (véase, por ejemplo, WO2011116123, US 9,150,489) y diflunisal (genérico), se pueden usar para mantener la estructura tetramérica normal soluble de TTR y para limitar la cantidad de monómeros de TTR en la circulación. Por ejemplo, tafamidis se encuentra en activa investigación como un compuesto novedoso que se une a los sitios de unión a la tiroxina del tetrámero de TTR, con lo cual inhibe su disociación en monómeros y bloquea la etapa que limita la velocidad en la cascada de amiloidogénesis de TTR. Diflunisal se une y estabiliza las variantes de TTR familiares contra la formación de fibrillas mediada por ácido.

[0250] Los tratamientos de inhibición de ARN se unen al ARNm seleccionado como diana y suprimen de este modo la expresión de ARNm y previenen la traducción de la proteína correspondiente. Los resultados clínicos hasta el momento han indicado que el ARN interferente pequeño, por ejemplo, patisirán o revusirán (véase, por ejemplo, WO 2016033326) y Oligonucleótido de antisentido, por ejemplo, inotersén (véase, por ejemplo, US 8 101 743 y 9 061 044), son enfoques potentes para eliminar la producción de proteína TTR mediante la activación de la degradación de ARNm TTR o la inhibición de la traducción.

[0251] Se está investigando patisirán, un tratamiento de ARNip en un ensayo clínico multicéntrico de fase III sobre la amiloidosis ATTR hereditaria en pacientes con polineuropatía (hATTR-PN, por su sigla en inglés). También se está investigando inotersén (IONIS-TTRRx), un oligonucleótido de antisentido que se administra por vía subcutánea y se dirige al mismo grupo de pacientes que el patisirán.

[0252] Los oligonucleótidos de antisentido (ASO, por su sigla en inglés) se encuentran en investigación por su capacidad de inhibir la expresión hepática de la proteína TTR amiloidogénica. Actualmente, el compuesto de ASO, ISIS-TTR<sub>Rx</sub>, se encuentra en investigación en un ensayo clínico multicéntrico, aleatorizado, con doble enmascaramiento, comparativo con placebo de fase 3 en pacientes con polineuropatía amiloide familiar (FAP).

[0253] Los degradadores amiloides tales como la biterapia doxiciclina/ácido tauroursodesoxicólico tienen el potencial de eliminar la TTR amiloide que se deposita en los órganos. Por ejemplo, la combinación de doxiciclina y ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA)

altera las fibrillas amiloides TTR y parece tener un perfil de seguridad aceptable en un estudio pequeño sin enmascaramiento de fase 2 entre 20 pacientes TTR.

[0254] Otro ejemplo de degradadores TTR son los anticuerpos anti-SAP. Los anticuerpos anti-SAP son anticuerpos contra una glucoproteína no fibrilar SAP, que promueve una reacción de células gigantes que elimina los depósitos amiloides en las vísceras.

## X. Ejemplos

### Ejemplo 1. Análisis previo a la formulación a concentración baja

[0255] Se llevaron a cabo estudios de producción previos a la formulación en un anticuerpo 14G8 humanizado con la secuencia de cadena pesada madura de la SEQ ID NO:82 (salvo por que la lisina de extremo C puede estar ausente) y la secuencia de cadena ligera madura de la SEQ ID NO:86. Se llevó a cabo el análisis previo a la formulación con el anticuerpo 14G8 humanizado en 20 formulaciones que contenían combinaciones de diversos amortiguadores en un intervalo de pH de alrededor de 4,5 a alrededor de 7,0 con y sin determinados azúcares, tensioactivos y otros excipientes.

[0256] Se evaluaron las propiedades de las formulaciones mediante métodos que incluyen la inspección visual, retrodispersión dinámica de luz (DLS, por su sigla en inglés) obtención de imágenes por microflujo (MFI, por su sigla en inglés), fluorimetría de barrido diferencial (DSF, por su sigla en inglés), calorimetría de barrido diferencial (DSC, por su sigla en inglés) y cromatografía por exclusión de tamaño de alto rendimiento (HP-SEC).

[0257] Los amortiguadores analizados fueron citrato, histidina, succinato y un fosfato en una concentración que varía de alrededor de 10 mM a alrededor de 20 mM. Los azúcares analizados fueron trehalosa y sacarosa en una concentración que varía de alrededor de 205 mM a alrededor de 230 mM. Se analizaron las formulaciones con trehalosa en un amortiguador de citrato o histidina, así como formulaciones con sacarosa en cualquiera de los cuatro amortiguadores.

[0258] Los tensioactivos analizados fueron PS20, PS80 y poloxámero 188 en una concentración que varía de alrededor de 0,02 % p/p a alrededor de 0,04 % p/p. Se analizó PS20 en diversas formulaciones. Se analizaron poloxámero y PS80 solamente en una formulación, que contenía trehalosa en un amortiguador de histidina.

[0259] Los excipientes adicionales analizados fueron L-arginina, L-lisina y NaCl en

concentraciones que varían de alrededor de 25 mM a alrededor de 160 mM en formulaciones de histidina con y sin trehalosa o PS20.

[0260] Se asignaron valores a los resultados de las formulaciones en cada uno de estos análisis (F1-F20) de acuerdo con el grado de cambio relativo en comparación con T0.

5 Las circunstancias más favorables fueron aquellas en las que no se observaron cambios. Las circunstancias inaceptables fueron aquellas en las que se observaron mayores cambios. Se asignaron valores adicionales a las circunstancias en las cuales se observaron pequeños cambios y en las cuales se observaron cambios intermedios. En las Tablas 2-3 se informan los resultados de someter a las muestras a estrés de congelación y descongelación (T-FT) y  
10 almacenamiento durante 1 semana a 50 °C (T-50) según se determinó por inspección visual, MFI, DLS y HP-SEC. En la Tabla 2 se proporciona una lista de propiedades comunes de las formulaciones en las cuales no se observaron grandes cambios en cualquiera de los análisis. En general, las formulaciones F13 y F20, las cuales carecían de tensioactivo, presentaron el  
15 pero rendimiento bajo estrés. Las formulaciones con un pH de 4,5 o menos o 7,0 o más en general no tuvieron tan buen rendimiento como otras formulaciones. Las concentraciones de amortiguador de 10 mM no tuvieron tan buen rendimiento como las concentraciones de amortiguador de 20 mM. La presencia de azúcares fue beneficiosa, si bien las formulaciones sin azúcares y una concentración elevada de L-arginina tuvieron mejor rendimiento que las formulaciones que carecen tanto de azúcares como de concentraciones elevadas de L-arginina.

20 [0261] En la Tabla 2 se proporciona una lista de conclusiones de las formulaciones que presentan un rendimiento respetable en todos los análisis (es decir, sin grandes cambios).

Tabla 2

| Conclusión                                                                    | Detalles                           |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Intervalo de pH adecuado                                                      | 5-6,5                              |
| Amortiguadores adecuados                                                      | Citrato, histidina o fosfato 20 mM |
| Es beneficiosa la presencia de azúcares o concentración elevada de L-arginina | Trehalosa o sacarosa 230 mM        |

|                          |                           |
|--------------------------|---------------------------|
| Se necesita tensioactivo | PS20 o PS80 al 0,02 % p/p |
|--------------------------|---------------------------|

[0262] En la Tabla 3 se proporciona una lista de combinaciones específicas de excipientes que no presentaron grandes cambios en ningún análisis en particular.

Tabla 3

5

| Formulación<br>n | pH  | Amortiguador    | Excipiente 1<br>(azúcar) | Excipiente 2<br>(tensioactivo) | Otros excipientes |
|------------------|-----|-----------------|--------------------------|--------------------------------|-------------------|
| <b>F2</b>        | 5,0 | Citrato 20 mM   | Trehalosa 230 mM         | PS20 al 0,02 % p/p             | -                 |
| <b>F8</b>        | 6,0 | Histidina 20 mM | Sacarosa 230 mM          | PS20 al 0,02 % p/p             | -                 |
| <b>F10</b>       | 6,5 | Fosfato 20 mM   | Sacarosa 230 mM          | PS20 al 0,02 % p/p             | -                 |
| <b>F11</b>       | 6,5 | Citrato 20 mM   | Sacarosa 230 mM          | PS20 al 0,02 % p/p             | -                 |
| <b>F14</b>       | 6,0 | Histidina 20 mM | Trehalosa 230 mM         | PS80 al 0,02 % p/p             | -                 |
| <b>F16</b>       | 6,0 | Histidina 20 mM | -                        | PS20 al 0,02 % p/p             | L-arginina 160 mM |

[0263] Sin embargo, debido a que todas las formulaciones presentaron cambios intermedios en al menos uno de los análisis, se llevaron a cabo otras modificaciones de las formulaciones, tal como se trata en el Ejemplo 2, para crear formulaciones que proporcionen las condiciones más estabilizantes para el anticuerpo.

10

### **Ejemplo 2: Selección de formulación a 50 mg/ml**

[0264] Según los resultados de la selección previa a la formulación, las formulaciones F21-F31 enumeradas en la Tabla 4 se sometieron a análisis a una concentración de 50 mg/ml de anticuerpo.

15 [0265] Tabla 4: Lista de formulaciones analizadas a 50 mg/ml

Tabla 4

| Formulación<br>n | pH  | Amortiguador    | Excipiente 1<br>(azúcar) | Excipiente 2<br>(tensioactivo) | Otros excipientes |
|------------------|-----|-----------------|--------------------------|--------------------------------|-------------------|
| <b>F21</b>       | 6,5 | Histidina 25 mM | Trehalosa 230            | PS20 al                        | -                 |

|            |     |                 |                  |                     |                  |
|------------|-----|-----------------|------------------|---------------------|------------------|
|            |     |                 | mM               | 0,02 % p/p          |                  |
| <b>F22</b> | 6,0 | Histidina 20 mM | Sacarosa 240 mM  | PS20 al 0,02 % p/p  | -                |
| <b>F23</b> | 6,5 | Histidina 20 mM | Sacarosa 240 mM  | PS20 al 0,02 % p/p  | -                |
| <b>F24</b> | 7,0 | Histidina 20 mM | Sacarosa 240 mM  | PS20 al 0,02 % p/p  | -                |
| <b>F25</b> | 6,0 | Histidina 20 mM | Sacarosa 240 mM  | PX188 al 0,04 % p/p | -                |
| <b>F26</b> | 6,0 | Fosfato 20 mM   | Sacarosa 240 mM  | PS20 al 0,02 % p/p  | -                |
| <b>F27</b> | 6,0 | Succinato 20 mM | Sacarosa 240 mM  | PS20 al 0,02 % p/p  | -                |
| <b>F28</b> | 6,0 | Histidina 20 mM | Trehalosa 240 mM | PS20 al 0,02 % p/p  | -                |
| <b>F29</b> | 6,0 | Histidina 20 mM | Sacarosa 30 mM   | PS20 al 0,02 % p/p  | Manitol 220 mM   |
| <b>F30</b> | 6,0 | Histidina 20 mM | Trehalosa 205 mM | PS20 al 0,02 % p/p  | L-arginina 25 mM |
| <b>F31</b> | 6,0 | Histidina 20 mM | Trehalosa 205 mM | PS20 al 0,02 % p/p  | L-lisina 25 mM   |

[0266] Se sometieron las muestras a pruebas de inspección visual, temperatura de transición vítrea, MFI, HP-SEC y cIEF según fue adecuado luego de la preparación (T-líquido), liofilización (T0), dos semanas de almacenamiento en estado líquido a 25 °C y un mes y tres meses de almacenamiento de las formas liofilizadas a 2-8 °C, 25 °C y 40 °C. A los resultados de las formulaciones en cada uno de estos análisis se asignaron los valores “malo”, “aceptable”, “bueno” y “muy bueno”. Las formulaciones aceptables tuvieron 4000-6000 partículas  $\geq 10\mu\text{m/ml}$  (F27), más de 94,0 % monómeros y menos que 3 % de especies con peso molecular elevado (F22-F27 y F30) y más que

74 % de isoformas principales luego del almacenamiento durante tres meses a 40 °C/75 % h.r. En la Tabla 5 se proporciona una lista de propiedades comunes de formulaciones que no recibieron un puntaje “malo” en ninguno de los análisis realizados.

- 5 [0267] Tabla 5: Lista de conclusiones de formulaciones que presentan un rendimiento de aceptable a muy bueno en todos los análisis.

Tabla 5

| <b>Conclusión</b>      | <b>Detalles</b>                 |
|------------------------|---------------------------------|
| pH óptimo              | 6,0                             |
| Amortiguadores óptimos | Histidina o succinato 20 mM     |
| Azúcares óptimos       | Trehalosa o sacarosa 205-240 mM |
| Tensioactivo óptimo    | PS20 o PX188 0,02 %-0,04 % p/p  |

10

- [0268] Tabla 6: Lista de formulaciones que presentan rendimiento de aceptable a muy bueno en todos los análisis.

15

Tabla 6

| <b>Formulació<br/>n</b> | <b>pH</b> | <b>Amortiguador</b> | <b>Excipiente 1<br/>(azúcar)</b> | <b>Excipiente 2<br/>(tensioactivo)</b> | <b>Otros<br/>excipientes</b> |
|-------------------------|-----------|---------------------|----------------------------------|----------------------------------------|------------------------------|
| <b>F25</b>              | 6,0       | Histidina 20 mM     | Sacarosa 240<br>mM               | PX188 al<br>0,04 % p/p                 | -                            |
| <b>F27</b>              | 6,0       | Succinato 20<br>mM  | Sacarosa 240<br>mM               | PS20 al<br>0,02 % p/p                  | -                            |
| <b>F30</b>              | 6,0       | Histidina 20 mM     | Trehalosa 205<br>mM              | PS20 al<br>0,02 % p/p                  | L-arginina 25<br>mM          |

- [0269] Se halló que la Formulación F25 fue superior a todas las formulaciones

analizadas, al presentar menos que 4000 partículas/ml, más que 96,0 % de monómeros con menos que 2,5 % especies de peso molecular elevado y 77 % de isoformas principales (determinado por cIEF) en la formulación líquida almacenada durante 2 semanas a 25 °C y en las formas liofilizadas almacenadas durante 1 mes y 3 meses a temperaturas analizadas (40 °C). Según estos estudios, la Formulación 25 (histidina-Hcl 20 mM, sacarosa 240 mM, poloxámero 0,04 %, pH 6,0) se identificó como el posible fármaco principal para mayor elaboración tal como se describe en el Ejemplo 3.

#### Ejemplo 3: Preparación y caracterización de la Formulación F25

[0270] Preparación de muestras: La formulación líquida prelioofilización fue 61 mg/ml de 14G8 humanizado, histidina 20 mM, sacarosa 240 mM y poloxámero al 0,04 %. Luego de la liofilización, se reconstituyó la formulación a una concentración de anticuerpo de alrededor de 50 mg/ml.

[0271] Se descongeló el material de partida congelado tal como se describió anteriormente en un baño de agua a 20 °C. Luego de descongelar, se mezcló el material de dos lotes y se determinó la concentración de proteína. La alícuota para el segundo lote se volvió a congelar a -80 °C hasta que se volviera a usar. Se ajustó la concentración de la muestra mediante dilución con amortiguador de formulación para obtener una concentración deseada de 50 mg/ml. Se agregó tensioactivo al agregar una alícuota de una solución madre concentrada en agua directamente en la formulación. Luego, se filtró la muestra a través de filtros de membrana PVDF de 0,22- $\mu$ m en una campana de flujo laminar. Por último se llenó la formulación filtrada en frascos de vidrio 20R tipo I lavados previamente; cada frasco con un volumen de llenado de 5 ml antes de cargarse en las placas del liofilizador.

[0272] Liofilización: Se llevó a cabo la liofilización de las muestras con el uso de un liofilizador de escala experimental Epsilon 2-12D (Martin Christ, Osterode, Alemania). Los procesos de liofilización se basaron en las temperaturas críticas del producto de la formulación seleccionada ( $T_g$  de -25,7 °C y una  $T_c$  de inicio de -25,3 °C) y se desarrollaron para DP activo. El punto de partida para las condiciones seleccionadas para llevar a cabo la liofilización se basó en pautas publicadas (véase, por ejemplo, Carpenter JF et ál., Pharm Res. agosto de 1997, 4(8):969-75; Jameel F et ál., capítulo

30 en *Formulation and Process Development Strategies for Manufacturing Biopharmaceuticals*, publicado en línea: agosto de 2010; y Remmele RL et ál, *Curr Pharm Biotechnol.*, marzo de 2012, 13(3):471-96). Se aplicó un protocolo de congelación habitual que se utiliza para formulaciones con sacarosa mediante enfriamiento a -45 °C con una velocidad de 0,5 °C/minuto. Se mantuvo la suposición inicial para la temperatura de almacenamiento durante el secado primario de modo que la temperatura de producto resultante se encuentre a Tg' medida y la temperatura de colapso medida, o debajo de estas, de la formulación, para evitar el colapso durante el secado primario. Se seleccionó una presión de cámara de 0,13 mbar de modo que el vacío se encontrara dentro de un intervalo práctico para secar tanto a escala de laboratorio, experimental como comercial (el intervalo recomendado de presión de cámara es 0,07-0,20 mbar), considerando también el contenido de sólidos de la formulación. Por tanto, la presión de cámara seleccionada aseguraría la sublimación óptima y la finalización del secado primario dentro de una período de tiempo razonable (a escala de laboratorio, aproximadamente 25 h). La temperatura de almacenamiento durante el secado secundario se mantuvo a 25 °C a una presión de cámara de 0,13 mbar. Para formulaciones con sacarosa con un contenido elevado de sólidos. Una temperatura de almacenamiento de 25-45 °C durante el secado secundario debería ser adecuada para la desorción de agua dentro de un tiempo razonable para lograr un contenido de humedad bajo sin perjudicar la calidad del producto (Pikal MJ, *International Journal of Pharmaceutics*, 1990, 60:203-217; Startzel P et ál., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 104:2345-2358; y Davis JM et ál, *Pharm Dev Technol.* 2013, julio-agosto, 18(4): 883-96.). Las velocidades de aumento gradual del secado primario al secundario se mantuvieron bajas (conservadoras) para evitar el aumento de temperatura del producto por encima de la temperatura de almacenamiento (y posiblemente por encima de la Tg) durante las fases iniciales del secado secundario cuando el contenido de humedad en el producto es elevado. El vacío durante el proceso de liofilización se controló con un indicador de capacidad (MKS). Durante el proceso de liofilización, se cubrió la puerta de plexiglás del liofilizador con una protección de acero inoxidable para reducir la radiación de calor. Para producir muestras de diferentes humedades residuales y para caracterizar el comportamiento

de secado de la formulación en el transcurso de los procesos, se llevó a cabo un cierre de una única placa en los siguientes momentos de toma de muestras: 1) T-IPC1: al final del secado primario; 2) T-IPC2: luego del aumento a la temperatura de secado secundario (25 °C); 3) T-IPC3: luego de 5 h (Des. Disp. #1) y 6 h (Des. Disp. #2) del secado secundario a 25 °C; 4) T-final (=T0): al final del secado secundario.

Caracterización analítica de la Formulación 25 liofilizada:

[0273] Apariencia óptica: En general, las formulaciones liofilizadas en el transcurso del secado (T-IPC1, T-IPC2, T-IPC3) presentaron excelente conservación de la estructura de torta con tortas blancuzcas.

[0274] Valoración con Karl Fischer: Se determinó el contenido de agua de las tortas liofilizadas con el aparato de valoración coulométrico de Karl Fischer Aqua 40.00 (Analytik Jena GmbH, Jena, Alemania), que se equipa con un módulo con espacios vacíos. Para la cuantificación, se pesaron alrededor de 15 mg de muestra en frascos de vidrio 2R en una cámara de bioseguridad con guantes en condiciones de humedad controladas (humedad relativa < 5 %) y se calentó a 120 °C en el horno conectado al recipiente de reacción mediante un sistema de tuberías. Se transfirió el agua evaporada a la solución de valoración y se determinó la cantidad de agua. Se llevó a cabo la cuantificación hasta que ya no hubo evaporación de agua detectable. Se calculó el contenido de agua de la muestra considerando la humedad ambiental según se determinó en tres blancos. Al final de ambos ciclos, todas las muestras tuvieron una humedad residual de  $\leq 1,0$  %.

[0275] Calorimetría de barrido diferencial (DSC): Se utilizó calorimetría de barrido diferencial (DSC) en un Mettler Toledo DSC1\_943 (Mettler Toledo, Giessen, Alemania) para determinar los eventos térmicos de la formulación congelada, por ejemplo, la temperatura de transición vítrea de los productos liofilizados ( $T_g$ ). Para los análisis físicoquímicos del producto seco, se analizaron 10 mg del producto liofilizado en crisoles Al plegados (Mettler Toledo, Giessen, Alemania). Se enfriaron las muestras a 0 °C con 10 K/min y se volvieron a calentar a 120 °C con una velocidad de barrido de 10 K/min. Este perfil de temperatura se repitió en un segundo ciclo. El punto medio del cambio endotérmico respecto a la referencia durante el barrido de calor se tomó como  $T_g$ . La temperatura de transición vítrea varió inversamente con el contenido de

humedad residual.

[0276] Difracción de rayos X en polvo (XRD): Se utilizó la difracción de rayos X en polvo (XRD) gran angular para estudiar la morfología de los productos liofilizados. Se utilizó el difractómetro de rayos X Empyrean (Panalytical, Almelo, Países Bajos) equipado con un ánodo de cobre (45 kV, 40 mA, emisión  $K\alpha_1$  a una longitud de onda de 0,154 nm) y un detector PIXcel3D. Se analizaron aproximadamente 100 mg de las muestras liofilizadas en el modo de reflexión en el intervalo angular de 5-45° 2 $\theta$ , con un tamaño de escalonado de 0,04° 2 $\theta$  y un tiempo de conteo de 100 segundos por escalón. La morfología/cristalinidad de las tortas liofilizadas de las muestras generadas en el transcurso de la liofilización (T-IPC1, T-IPC2, T-IPC3, T0) en ambos procesos de liofilización se determinaron mediante XRD. Todas las muestras presentaron una estructura de torta totalmente amorfa y no se detectaron picos distintivos en referencia a la cristalización de sales de amortiguador ni otros excipientes. En todas las muestras, se observó solamente un pico amplio con un máximo de aproximadamente 20 grados 2 $\theta$ , que es característico de las muestras amorfas (Liu W et ál, AAPS Pharmscitech, 2005, tomo 6(2)).

[0277] Reconstitución de las formulaciones liofilizadas: Se determinó el volumen de reconstitución mediante el peso de cuatro frascos por placa antes y después de la liofilización para ambos ciclos para determinar la masa del agua eliminada. Se reconstituyeron las muestras de los productos liofilizados (placebo y frascos activos) en una campana de flujo laminar de acuerdo con el siguiente procedimiento: se agregó la cantidad necesaria de agua ultrapura (agua Milli-Q) al producto liofilizado (en el centro del frasco) con el uso de una pipeta. Se giró cuidadosamente el frasco (se evitó la agitación). Se midió el tiempo de reconstitución como el tiempo para lograr una reconstitución total del producto liofilizado luego de la adición del líquido. Se juzgó el comportamiento de reconstitución, principalmente con respecto al espumado. Se muestra el tiempo de reconstitución (disolución de todos los sólidos visibles) de las muestras generadas en el transcurso de la liofilización (T-IPC1, T-IPC2, T-IPC3, T0) en ambos procesos de liofilización según se determinó luego de la adición de agua ultrapura a los liofilizados en la Tabla 7. Luego de la adición de 4,5 ml de agua ultrapura se completó la reconstitución de los productos finales en menos de 4

minutos.

[0278] Tabla 7: Tiempos de reconstitución de muestras generadas en diferentes momentos durante la liofilización

Tabla 7

| Momento   | Tiempo de reconstitución [mm:ss] |                  |
|-----------|----------------------------------|------------------|
|           | Desarr. disp. #1                 | Desarr. disp. #2 |
| T-líquido | -                                | -                |
| T-IPC1    | 01:55                            | 04:26            |
| T-IPC2    | 02:33                            | 04:20            |
| T-IPC3    | 02:32                            | 05:03            |
| T-final   | 01:35                            | 03:52            |

[0279] pH: Se midió el pH de la Formulación con un medidor de pH calibrado (SevenEasy®, Mettler Toledo AG, Schwerzenbach, Suiza) con un electrodo de poca potencia iónica (InLab® Pure Pro) o un electrodo de potencia iónica normal/elevada (InLab® Micro). Se muestra el valor de pH de todas las muestras generadas en el transcurso de la liofilización (T-IPC1, T-IPC2, T-IPC3, T0) en ambos procesos de liofilización luego de la reconstitución en la Tabla 8. No se observaron cambios en el pH antes y después de la liofilización. Luego de la preparación (T-líquido), se logró el valor de pH deseado de 6,0 en ambos ciclos y los valores de pH permanecieron dentro del intervalo deseado de  $6,0 \pm 0,1$  en el transcurso y luego de los dos procesos de liofilización.

[0280] Tabla 8: valores de pH de las muestras generadas en diferentes momentos durante la liofilización.

Tabla 8

| Momento   | Puntaje visual |               |
|-----------|----------------|---------------|
|           | Des. Disp. #1  | Des. Disp. #2 |
| T-líquido | 6,0            | 6,0           |
| T-IPC1    | 6,1            | 6,0           |
| T-IPC2    | 6,0            | 6,0           |

|                |     |     |
|----------------|-----|-----|
| <b>T-IPC3</b>  | 6,0 | 6,0 |
| <b>T-final</b> | 6,0 | 5,9 |

[0281] Osmolalidad: Se midió la osmolalidad de las muestras mediante el método de descenso crioscópico con un osmómetro automático Knauer Semi-Micro n.º A0300 (Knauer, Berlín, Alemania). Se muestra la osmolalidad de todas las muestras generadas en el transcurso de la liofilización (T-IPC1, T-IPC2, T-IPC3, T0) en ambos procesos de liofilización luego de la reconstitución en la Tabla 9. La osmolalidad luego de la preparación (T-líquido) se encontró dentro del intervalo fisiológico (270 – 330 mOsmol/kg) y se mantuvo básicamente sin cambios en el transcurso y luego de la liofilización.

[0282] Tabla 9: Osmolalidad de las muestras generadas en diferentes momentos durante la liofilización.

Tabla 9

| <b>Momento</b>   | <b>Osmolalidad [mOsmol/kg]</b> |                      |
|------------------|--------------------------------|----------------------|
|                  | <b>Des. Disp. #1</b>           | <b>Des. Disp. #2</b> |
| <b>T-líquido</b> | 317                            | 310                  |
| <b>T-IPC1</b>    | 314                            | 317                  |
| <b>T-IPC2</b>    | 321                            | 314                  |
| <b>T-IPC3</b>    | 319                            | 315                  |
| <b>T-final</b>   | 320                            | 314                  |

[0283] Espectroscopía UV-Vis: Se utilizó un lector de placas Tecan Safire<sup>2</sup> (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) para la determinación de la concentración y la evaluación de la turbidez. Se prepararon triplicados de 200 µl de las muestras en placas de 96 pocillos (Corning Incorporation, NY, E.U.A). Luego de la medición, se corrigieron los valores de absorción obtenidos para la trayectoria y se restaron con blancos correspondientes. Se diluyeron todas las muestras a 0,5<sup>-1</sup> mg/ml en amortiguador de placebo antes de la

medición. Se utilizó un coeficiente de extinción según una concentración de 1 mg/ml a una trayectoria de 1 cm de  $1,404 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 280 nm para el cálculo de la concentración (información de Rentschler). Además, se utilizó un aumento de densidad óptica a 350 nm de retrodispersión de luz de partículas para evaluar la turbidez de las muestras. Para calcular el índice de agregación (A.I., por su sigla en inglés) se utilizó la siguiente ecuación:  $A.I. = 100 \cdot (A_{350} / (A_{280} - A_{350}))$ . Se muestra la concentración de proteína de todas las muestras (n=3) generadas en el transcurso de la liofilización (T-IPC1, T-IPC2, T-IPC3, T0) en ambos procesos de liofilización luego de la reconstitución en la Tabla 10. Luego de la preparación (T-líquido), se logró la concentración deseada de  $50 \pm 2,5 \text{ mg/ml}$  para todas las muestras y se mantuvo dentro de la especificación en el transcurso y luego de la liofilización.

[0284] Tabla 10: Concentración de proteína de las muestras generadas en diferentes momentos durante la liofilización.

Tabla 10

| Momento          | Concentración de |                |
|------------------|------------------|----------------|
|                  | Des. Disp. #1    | Des. Disp. #2  |
| <b>T-líquido</b> | 48,8 $\pm$ 0,5   | 49,7 $\pm$ 0,4 |
| <b>T-IPC1</b>    | 48,3 $\pm$ 0,5   | 51,8 $\pm$ 0,1 |
| <b>T-IPC2</b>    | 47,8 $\pm$ 0,3   | 51,5 $\pm$ 0,3 |
| <b>T-IPC3</b>    | 47,9 $\pm$ 0,5   | 51,2 $\pm$ 0,2 |
| <b>T-final</b>   | 51,0 $\pm$ 0,3   | 48,7 $\pm$ 0,1 |

[0285] Cromatografía por exclusión de tamaño de alto rendimiento (HP-SEC): Se llevó a cabo la HP-SEC de acuerdo con la información obtenida de Rentschler. De las muestras habituales de filtración en gel (GFS, por su sigla en inglés) Bio-Rad y de anticuerpo, se cargó una cantidad de 20  $\mu\text{g}$  en la columna (se utilizó una concentración de 1 mg/ml). Tal como se muestra en la Tabla 11, no se observaron cambios en sólidos de peso molecular bajo y con liofilización, y los cambios en los sólidos de peso molecular elevado fueron pequeños o nulos. Por tanto, la liofilización mantiene la gran

mayoría del anticuerpo en forma monomérica.

[0286] Tabla 11: Contenido relativo de diferentes especies en las muestras generadas en momentos diferentes durante la liofilización.

Tabla 11

| Momento   | Monómero [%]  |               | HMWS [%]      |               | LMWS [%]      |               | Área pico total [mAu*min] |               |
|-----------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------------------|---------------|
|           | Des. disp. #1 | Des. disp. #2 | Des. disp. #1 | Des. disp. #2 | Des. disp. #1 | Des. disp. #2 | Des. disp. #1             | Des. disp. #2 |
| T-líquido | 97,4          | 97,4          | 1,1           | 1,2           | 1,5           | 1,4           | 762,7                     | 746,8         |
|           | ±             | ±             | ±             | ±             | ±             | ±             | ±                         | ±             |
|           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,4                       | 85,2          |
| T-IPC1    | 97,6          | 97,3          | 0,9           | 1,3           | 1,5           | 1,4           | 757,6                     | 649,9         |
|           | ±             | ±             | ±             | ±             | ±             | ±             | ±                         | ±             |
|           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,3                       | 65,5          |
| T-IPC2    | 97,6          | 97,3          | 0,9           | 1,3           | 1,5           | 1,4           | 761,3                     | 687,9         |
|           | ±             | ±             | ±             | ±             | ±             | ±             | ±                         | ±             |
|           | 0,1           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,1           | 0,1           | 0,3                       | 8,2           |
| T-IPC3    | 97,6          | 96,7          | 0,9           | 1,9           | 1,5           | 1,3           | 753,6                     | 534,3         |
|           | ±             | ±             | ±             | ±             | ±             | ±             | ±                         | ±             |
|           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 2,9                       | 119,2         |
| T-final   | 97,6          | 96,7          | 0,9           | 1,9           | 1,5           | 1,4           | 770,3                     | 503,9         |
|           | ±             | ±             | ±             | ±             | ±             | ±             | ±                         | ±             |
|           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,1           | 0,0           | 0,3                       | 82,6          |

5

[0287] Se pueden realizar diversos cambios en cuanto a forma y detalles en la presente sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. A menos que resulte evidente otra cosa por el contexto, se puede utilizar cualquier modalidad, aspecto, elemento, característica, etapa o similar en combinación con cualquier otro. En cuanto a que la información asociada con una cita puede cambiar con el tiempo, se hace referencia a la información asociada con la cita a la primera fecha de presentación efectiva, donde la primera fecha de presentación efectiva para una cita significa la fecha de presentación de la presente solicitud o una solicitud de prioridad anterior que describe la cita. Todas las referencias, patentes emitidas y solicitudes de patente citadas dentro del cuerpo de la presente memoria descriptiva se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia a todos los efectos. Se puede combinar cualquier modalidad, aspecto, característica, elemento, etapa o similar con cualquier otro a menos que el contexto claramente indique lo contrario. Cuando se dice que una composición comprende determinados componentes específicos, se debe entender, a menos que el contexto

10

15

requiera algo diferente, que la solicitud describe que alternativamente la composición puede consistir o consistir básicamente en los componentes especificados. Por ejemplo, cuando se dice que una cadena de anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una SEQ ID NO. especificada, debe entenderse que, a menos que el contexto requiera otra cosa, alternativamente la cadena de anticuerpo puede consistir o consistir básicamente en la SEQ ID NO. “Consiste básicamente en” se utiliza de acuerdo con la convención para designar los componentes básicos y novedosos de una composición. A menos que resulte evidente de otra forma a partir del contexto, también puede haber agua presente en cualquier cantidad. Otros componentes pueden estar presentes en menores cantidades sin efectos significativos en la actividad ni estabilidad de la composición. “Carece básicamente de” se define asimismo para indicar que un componente puede estar presente, si es que lo está, solamente en pocas cantidades. Cuando se dice que un componente de una composición está presente a una concentración de “alrededor de” un valor o intervalo de valores designado, debe entenderse la solicitud como que describe alternativamente que el componente puede estar presente al valor o intervalo de valores designado.

## REIVINDICACIONES

SE REIVINDICA LO SIGUIENTE:

1. Una formulación farmacéutica que comprende:

(a) un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende tres CDR de la SEQ ID NO:61 y una región variable de cadena ligera madura que comprende tres CDR de la SEQ ID NO:70, salvo por que cada una de las posiciones H52 y L26 según la numeración de Kabat puede ser independientemente N o S, o un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende tres CDR de SEQ ID NO:1 y una región variable de cadena ligera madura que comprende tres CDR de SEQ ID NO:16, en donde el anticuerpo se encuentra presente a una concentración dentro del intervalo de alrededor de 25 mg/mL a alrededor de 75 mg/mL;

(b) un amortiguador presente a una concentración de alrededor de 20 mM, en donde el amortiguador es citrato, histidina, fosfato o succinato;

(c) un azúcar presente a una concentración dentro del intervalo de alrededor de 205 mM a alrededor de 260 mM, en donde el azúcar es sacarosa o trehalosa o, si el azúcar se encuentra ausente, hay alrededor de 160 mM de arginina presente, y

(d) un tensioactivo presente a una concentración dentro del intervalo de alrededor de 0,01 % a alrededor de 1 % en peso;

en donde la formulación se caracteriza por un pH dentro del intervalo de alrededor de 5,0 a alrededor de 6,5; siempre que:

(i) si hay amortiguador de histidina o succinato presente, el pH es alrededor de 6,0;

(ii) si hay amortiguador de fosfato presente, el pH es alrededor de 6,5; y

(iii) si hay histidina y trehalosa presentes el tensioactivo es

a. PS80; o

b. PS20, siempre que si hay PS20 presente, también haya presente alrededor de 25 mM de L-arginina.

2. La formulación de la reivindicación 1, que carece básicamente de manitol o

sorbitol.

3. La formulación de la reivindicación 1, en donde el amortiguador es histidina.
4. La formulación de la reivindicación 3, en donde el azúcar se encuentra presente en un intervalo de alrededor de 230 mM a alrededor de 250 mM.
- 5 5. La formulación de la reivindicación 4, en donde el azúcar se encuentra presente a alrededor de 230-240 mM .
6. La formulación de la reivindicación 5, en donde el azúcar es sacarosa y el tensioactivo es PS20 o PX188.
7. La formulación de la reivindicación 6, en donde el tensioactivo es PS20 a una  
10 concentración de 0,02 % p/p.
8. La formulación de la reivindicación 7, en donde el tensioactivo es PX188 a una concentración de 0,04 % p/p.
9. La formulación de la reivindicación 5, en donde el azúcar es trehalosa.
10. La formulación de la reivindicación 1, en donde hay presente 160 mM de arginina.
- 15 11. La formulación de la reivindicación 1, en donde el amortiguador es citrato.
12. La formulación de la reivindicación 11, en donde el azúcar se encuentra presente a 230 mM.
13. La formulación de la reivindicación 12, en donde el tensioactivo es PS20 al 0,02 %.
14. La formulación de la reivindicación 1, en donde el amortiguador es fosfato.
- 20 15. La formulación de la reivindicación 14, en donde el azúcar se encuentra presente y es sacarosa.
16. La formulación de la reivindicación 1, en donde el amortiguador es succinato.
17. La formulación de la reivindicación 16, en donde el azúcar se encuentra presente y es sacarosa.
- 25 18. La formulación de la reivindicación 4, en donde el azúcar se encuentra presente y es trehalosa.
19. La formulación de la reivindicación 18, en donde la trehalosa se encuentra presente a una concentración de 205 mM.
20. La formulación de la reivindicación 4, en donde el tensioactivo es PS20.
- 30 21. La formulación de la reivindicación 1, que comprende:
  - (a) citrato 20 mM, trehalosa 230 mM y PS20 al 0,02 % p/p a pH 5;

- (b) histidina 20 mM, sacarosa 230 mM y PS20 al 0,02 % p/p;
- (c) fosfato 20 mM, sacarosa 230 mM y PS20 al 0,02 % p/p a pH 6,5;
- (d) citrato 20 mM, sacarosa 230 mM y PS20 al 0,02 % p/p a pH 6,5;
- (e) histidina 20 mM, trehalosa 230 mM y PS80 al 0,02 % p/p;
- (f) histidina 20 mM, PS20 al 0,02 % p/p y L-arginina 160 mM;
- (g) histidina 20 mM, sacarosa 240 mM y PX188 al 0,04 % p/p;
- (h) succinato 20 mM, sacarosa 240 mM y PS20 al 0,02 % p/p a un pH de 6,0; o
- (i) histidina 20 mM, trehalosa 205 mM, PS20 al 0,02 % p/p y L-arginina 25 mM.

22. La formulación de la reivindicación 21, en donde la formulación consiste

10 básicamente en el anticuerpo y alrededor de:

- (a) citrato 20 mM, trehalosa 230 mM y PS20 al 0,02 % p/p a pH 5;
- (b) histidina 20 mM, sacarosa 230 mM y PS20 al 0,02 % p/p;
- (c) fosfato 20 mM, sacarosa 230 mM y PS20 al 0,02 % p/p a pH 6,5;
- (d) citrato 20 mM, sacarosa 230 mM y PS20 al 0,02 % p/p a pH 6,5;
- (e) histidina 20 mM, trehalosa 230 mM y PS80 al 0,02 % p/p;
- (f) histidina 20 mM, PS20 al 0,02 % p/p y L-arginina 160 mM;
- (g) histidina 20 mM, sacarosa 240 mM y PX188 al 0,04 % p/p;
- (h) succinato 20 mM, sacarosa 240 mM y PS20 al 0,02 % p/p a un pH de 6,0; o
- (i) histidina 20 mM, trehalosa 205 mM, PS20 al 0,02 % p/p y L-arginina 25 mM..

23. La formulación de la reivindicación 22, en donde la formulación consiste  
básicamente en el anticuerpo y alrededor de:

- (a) histidina 20 mM, sacarosa 240 mM y PX188 al 0,04 % p/p;
- (b) succinato 20 mM, sacarosa 240 mM y PS20 al 0,02 % p/p a un pH de 6,0; o
- (c) histidina 20 mM, trehalosa 205 mM, PS20 al 0,02 % p/p y L-arginina 25 mM..

24. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:65, y una región variable de cadena ligera madura que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:76.

25. La formulación de la reivindicación 24, en donde la formulación consiste  
básicamente en el anticuerpo a alrededor de 50 mg/ml, y alrededor de 20 mM de histidina, alrededor de 240 mM de sacarosa y alrededor de 0,04 % p/p de PX188.

26. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende las tres CDR según Kabat de SEQ ID NO:61, y una región variable de cadena ligera madura que comprende las tres CDR según Kabat de SEQ ID NO:70 salvo por que cada una de las posiciones H52 y L26 según la numeración de Kabat puede ser independientemente N o S.

27. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1-25, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende las tres CDR según Kabat de SEQ ID NO:1, y una región variable de cadena ligera madura que comprende las tres CDR según Kabat de SEQ ID NO:16.

28. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado, quimérico o chapeado.

29. La formulación de la reivindicación 28, en donde el anticuerpo monoclonal es humanizado.

30. La formulación de la reivindicación 29, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:64-66 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:74-76.

31. La formulación de la reivindicación 29, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 5-12 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 19-23.

32. La formulación de la reivindicación 30, en donde la cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:65 y la cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:76.

33. La formulación de la reivindicación 31, en donde la cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:11 y la cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:19.

34. El anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 28-33, en donde la región variable de cadena pesada madura se fusiona a una región constante de cadena pesada y la región variable de la cadena ligera madura se fusiona a una región constante de cadena ligera.

35. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 34, en donde la región variable de cadena pesada madura se fusiona a una región constante de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO:103 siempre que la lisina de extremo C pueda estar ausente y/o la región variable de cadena ligera madura se fusiona a una región constante de cadena ligera que tiene la SEQ ID NO:104 o 105.

36. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo monoclonal se encuentra presente a una concentración de alrededor de 50 mg/mL.

37. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el amortiguador de histidina se encuentra a una concentración de alrededor de 20 mM.

38. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el pH es de alrededor de 5,75 a 6,25.

39. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el azúcar /poliol es sacarosa presente a una concentración de alrededor de 240 mM.

40. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el poloxámero es poloxámero 188 a una concentración de alrededor de 0,04 % en peso.

41. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde menos que alrededor de 5 % o 3 % en peso del anticuerpo se encuentra presente como un agregado en la formulación.

42. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde al menos 95 % o 97 % de anticuerpo en peso se desarrolla como un único pico en análisis HP-SEC.

43. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1-42, que es estéril.

44. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1-43, que es estable en congelación y descongelación.

45. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1-44, que tiene una osmolalidad de alrededor de 270 mOsmol/kg a alrededor de 330 mOsmol/kg.

46. Una formulación liofilizada de un anticuerpo, que comprende

(a) un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende tres CDR de SEQ ID NO:61 y una región variable de cadena ligera madura que comprende tres CDR de SEQ ID NO:70, salvo por que cada una de las posiciones H52 y L26 según la numeración de Kabat puede ser independientemente N o S, o un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende tres

CDR de SEQ ID NO:1 y una región variable de cadena ligera madura que comprende tres CDR de SEQ ID NO:16;

- (b) histidina;
- (c) un azúcar/poliol; y
- (d) un poloxámero.

47. La formulación liofilizada de la reivindicación 46 preparada mediante la liofilización de la formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 45.

48. La formulación liofilizada de la reivindicación 46, que se puede reconstituir con agua a un pH de entre alrededor de 5,5 y alrededor de 6,5.

49. La formulación liofilizada de la reivindicación 46, que se puede reconstituir con agua a un pH de alrededor de 6,0.

50. La formulación liofilizada de la reivindicación 46, que contiene alrededor de 10 mg a alrededor de 40 mg del anticuerpo

51. Una formulación liofilizada, que se puede reconstituir con agua para proporcionar una solución acuosa que comprende:

(a) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende tres CDR de la SEQ ID NO:61 y una región variable de cadena ligera madura que comprende tres CDR de la SEQ ID NO:70, salvo por que cada una de las posiciones H52 y L26 según la numeración de Kabat puede ser independientemente N o S, o un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende tres CDR de SEQ ID NO:1 y una región variable de cadena ligera madura que comprende tres CDR de SEQ ID NO:16 en donde el anticuerpo se encuentra presente a una concentración dentro del intervalo de alrededor de 25 mg/mL a alrededor de 75 mg/mL;

(b) amortiguador presente a una concentración dentro de un intervalo de alrededor de 10 mM a alrededor de 30 mM;

(c) azúcar/poliol presente a una concentración dentro de un intervalo de alrededor de 220 mM a alrededor de 260 mM;

(d) tensioactivo presente a una concentración dentro de un intervalo de alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,1 % en peso; y

(e) un pH dentro de un intervalo de alrededor de 5,5 a alrededor de 7,0..

52. La formulación liofilizada de la reivindicación 51, en donde el anticuerpo

comprende una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:64-66 y una región variable de cadena ligera madura que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:74-76, o un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:5-12 y una región variable de cadena ligera madura que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:19-23.

53. La formulación liofilizada de la reivindicación 52, que se puede reconstituir con agua de modo que el anticuerpo se encuentra presente a una concentración de alrededor de 50 mg/mL.

54. La formulación liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 51-53, en donde el amortiguador comprende histidina.

55. La formulación liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 51-54, que se puede reconstituir con agua de modo que el pH sea alrededor de 6,0.

56. La formulación liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 51-55, en donde el azúcar /poliol es sacarosa.

57. La formulación liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 51-56, en donde el tensioactivo es poloxámero.

58. La formulación liofilizada de la reivindicación 57, en donde el poloxámero es PX188.

59. La formulación liofilizada de la reivindicación 51, en donde:

(a) el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:64-66 y una región variable de cadena ligera madura que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:74-76 y se puede reconstituir a una concentración de alrededor de 50 mg/ml;

(b) el amortiguador es histidina y se puede reconstituir a una concentración de alrededor de 20 mM;

(c) el azúcar/poliol es sacarosa y se puede reconstituir a una concentración de alrededor de 240 mM; y

(d) el tensioactivo es poloxámero 188 y se puede reconstituir a una concentración de

alrededor de 0,04 % en peso.

60. La formulación liofilizada de la reivindicación 59, que se puede reconstituir con agua de modo que el pH sea alrededor de 6,0.

61. La formulación liofilizada de la reivindicación 60, en donde el anticuerpo  
5 comprende una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:65 y una región variable de cadena ligera madura que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:76.

62. La formulación liofilizada de la reivindicación 61, en donde la región variable de cadena pesada madura se fusiona con una región constante de cadena pesada que tiene la  
10 secuencia de la SEQ ID NO:103 siempre que la lisina de extremo C pueda estar ausente y la región variable de cadena ligera madura se fusiona con una región constante de cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO:104.

63. La formulación liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde al menos 95 o 97 % del anticuerpo se desarrolla como un único pico en HP-SEC luego  
15 del almacenamiento durante un máximo de 3 meses a 2-8 °C.

64. Un método de reconstitución de la formulación liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 46-63 que comprende:

combinar la formulación liofilizada con agua estéril para producir una formulación líquida.

65. El método de la reivindicación 64, que comprende además introducir la  
20 formulación reconstituida en una bolsa de líquido isotónico para infusión.

66. El método de la reivindicación 64, en donde la formulación liofilizada se encuentra en forma de polvo o en forma de una espuma sólida en un frasco.

67. Una forma de dosificación liofilizada estéril de una formulación de anticuerpo en  
25 un frasco de 20 ml que consiste básicamente en:

(i) un anticuerpo en un intervalo de alrededor de 225-275 mg;

(ii) histidina en un intervalo de alrededor de 15-19 mg;

(iii) poloxámero PX188 en un intervalo de alrededor de 2-2,5 mg; y;

(iv) sacarosa en un intervalo de alrededor de 400-490 mg;

30 en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende tres CDR de SEQ ID NO:61 y una región variable

de cadena ligera madura que comprende tres CDR de SEQ ID NO:70, salvo por que cada una de las posiciones H52 y L26 según la numeración de Kabat puede ser independientemente N o S, o un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende tres CDR de SEQ ID NO:1 y una región variable de cadena ligera madura que comprende tres CDR de SEQ ID NO:16.

68. La forma de dosificación liofilizada de la reivindicación 67, en donde el frasco tiene contenidos que consisten básicamente en:

- (i) alrededor de 250 mg del anticuerpo;
- (ii) alrededor de 16,8 mg de L-histidina;
- (iii) alrededor de 2,2 mg de poloxámero PX188; y
- (iv) alrededor de 445,3 mg de sacarosa.

69. La forma de dosificación liofilizada de la reivindicación 67 o 68, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende las tres CDR según Kabat de SEQ ID NO:61, y una región variable de cadena ligera madura que comprende las tres CDR según Kabat de SEQ ID NO:70 salvo por que cada una de las posiciones H52 y L26 según la numeración de Kabat puede ser independientemente N o S.

70. La forma de dosificación liofilizada de la reivindicación 67 o 68, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende las tres CDR según Kabat de SEQ ID NO:1, y una región variable de cadena ligera madura que comprende las tres CDR según Kabat de SEQ ID NO:16.

71. La forma de dosificación liofilizada de la reivindicación 67 o 68, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:64-66 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:74-76.

72. La forma de dosificación liofilizada de la reivindicación 67 o 68, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:5-12 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:19-23.

73. La forma de dosificación liofilizada de la reivindicación 67 o 68, en donde la cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:65 y la cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:76.

74. La forma de dosificación liofilizada de la reivindicación 67 o 68, en donde la cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:11 y la cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:19.

75. La forma de dosificación liofilizada de la reivindicación 67 o 68, en donde la región variable de cadena pesada madura se fusiona con una región constante de cadena pesada que tiene la secuencia de la SEQ ID NO:103 siempre que la lisina de extremo C pueda estar ausente y/o la región variable de cadena ligera madura se fusiona con una región constante de cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 104 o 105.

76. La forma de dosificación liofilizada de la reivindicación 67 o 68, en donde la cadena pesada madura tiene la secuencia de la SEQ ID NO:82, salvo por que la lisina de extremo C puede estar ausente, y la cadena ligera madura tiene la secuencia de la SEQ ID NO:86.

77. Un método para preparar la forma de dosificación liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 67-76 para la administración a un sujeto, que comprende:

(i) reconstituir la formulación de anticuerpo a un volumen de alrededor de 5,0 mL con agua estéril, y

(ii) diluir la formulación de anticuerpo reconstituida de la etapa (i) en solución salina normal para infusión.

78. El método de la reivindicación de 77, en donde el volumen total para infusión es 250 mL.

79. El método de la reivindicación de 77, en donde el volumen total para infusión es 100 mL.

80. El método de la reivindicación de 77, en donde el volumen total para infusión es 500 mL.

81. Una formulación reconstituida que resulta de la reconstitución de la formulación liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 46-80.

82. La formulación reconstituida de la reivindicación 81 que comprende el anticuerpo a una concentración de alrededor de 50 mg/mL, el amortiguador de histidina a una concentración de alrededor de 20 mM, poloxámero a una concentración de alrededor de 0,04 % en peso y a pH de alrededor de 6,0.

83. La formulación reconstituida de la reivindicación 81 u 82, en donde al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % del anticuerpo se desarrolla como un único pico en cromatografía por

exclusión de tamaño de alta presión.

84. Un método para tratar o llevar a cabo profilaxis de un sujeto que padezca o tenga riesgo de padecer una amiloidosis mediada por transtirretina, que comprende la administración al sujeto de un esquema eficaz de la formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-23 o una forma reconstituida de la formulación liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 46-63.

85. El método de la reivindicación 84, en donde el sujeto fue tratado anteriormente con un estabilizador de tetrámeros TTR, un tratamiento con oligonucleótido de antisentido, un tratamiento con interferencia por el ARN (iARN) o un degradador amiloide.

86. El método de la reivindicación 85, en donde el sujeto ya no recibe el tratamiento con el estabilizador de tetrámeros TTR, el tratamiento con oligonucleótidos de antisentido, el tratamiento con interferencia por el ARN (iARN) o el degradador amiloide.

87. El método de la reivindicación 84, en donde el sujeto recibe simultáneamente tratamiento con diflunisal.

88. El método de la reivindicación 84, en donde el sujeto recibe tratamiento simultáneamente con tafamidis.

89. El método de la reivindicación 84, en donde el sujeto recibe tratamiento simultáneamente con un estabilizador de tetrámeros TTR, un tratamiento con oligonucleótido de antisentido, un tratamiento con interferencia por el ARN (iARN) o un degradador amiloide.

90. El método de la reivindicación 89, en donde el sujeto recibe tratamiento simultáneamente con tafamidis, diflunisal, patisirán, inotersén, 4'-yodo-4'-desoxidoxorrubicina (IDOX), doxiciclina, ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA), ciclodextrina (CyD) o un anticuerpo anti-SAP.

91. El método de la reivindicación 84, en donde el sujeto fue diagnosticado con amiloidosis ATTR.

92. El método de la reivindicación 84, en donde el sujeto tiene miocardiopatía ATTR sin mutaciones.

93. El método de la reivindicación 84, en donde el sujeto tiene miocardiopatía ATTR hereditaria.

94. El método de la reivindicación 84, en donde el sujeto tiene polineuropatía ATTR hereditaria.

95. El método de la reivindicación 84, en donde el sujeto tiene afectación cardíaca por ATTR.

96. El método de la reivindicación 84, en donde el sujeto tiene afectación de neuropatía periférica por amiloidosis ATTR.

5 97. El método de la reivindicación 84, en donde la formulación farmacéutica, la forma reconstituida de la formulación liofilizada o la forma reconstituida de la formulación de anticuerpo liofilizada se administra al sujeto por vía intravenosa en forma diluida.

98. El método de la reivindicación 97, en donde el diluyente para la forma diluida es solución salina normal.

10 99. El método de la reivindicación 98, en donde el volumen total de la forma diluida administrada al sujeto es al menos alrededor de 100 mL.

100. El método de la reivindicación 99, en donde el volumen total de la forma diluida administrada al sujeto es al menos alrededor de 250 mL.

15 101. El método de la reivindicación 100, en donde el volumen total de la forma diluida administrada al sujeto es al menos alrededor de 500 mL.

102. El método de la reivindicación 100, en donde el volumen total es alrededor de 250 mL.

103. El método de la reivindicación 97, en donde 0,1, 0,2, 0,3, 1, 3, 10 o 30 mg/kg del anticuerpo se administra al sujeto alrededor de una vez cada 28 días.

20 104. El método de la reivindicación 103, en donde 0,1, 0,2, 0,3, 1 o 3 mg/kg del anticuerpo se administra al sujeto como una infusión en un intervalo de alrededor de 60 a 120 minutos.

105. El método de la reivindicación 103, en donde 10 o 30 mg/kg del anticuerpo se administran al sujeto como una infusión en un intervalo de alrededor de 90 a 180 minutos.

25 106. El método de la reivindicación 97, en donde se premedica al sujeto con un antihistamínico.

107. El método de la reivindicación 97, en donde se administra al sujeto difenhidramina en un intervalo de alrededor de 30 a 90 minutos antes de la administración del anticuerpo.

30 108. El método de la reivindicación 107, en donde se administra al sujeto paracetamol en un intervalo de alrededor de 30 a 90 minutos antes de la administración del anticuerpo.

109. El método de la reivindicación 84, en donde la duración del esquema es al menos 3 meses.

110. El método de la reivindicación 109, en donde la duración del esquema es al menos 12 meses.

5        111. El método de la reivindicación 84, en donde el sujeto recibe simultáneamente tafamidis.

10        112. Un método para tratar o realizar profilaxis a un sujeto que padece o tiene riesgo de padecer una amiloidosis mediada por transtirretina, que comprende administrar un esquema eficaz de un estabilizador de tetrámeros TTR, un tratamiento con oligonucleótido de antisentido, un tratamiento con interferencia por el ARN (iARN) o un degradador amiloide, en donde el sujeto fue tratado previamente con la formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-23 o una forma reconstituida de la formulación liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 46-63.

15        113. El método de la reivindicación 112, en donde el sujeto ya no recibe el tratamiento con la formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-45.

114. El método de la reivindicación 112, en donde el estabilizador de tetrámeros TTR es tafamidis o diflunisal.

115. El método de la reivindicación 112, en donde el tratamiento con oligonucleótido de antisentido es inotersén.

20        116. El método de la reivindicación 112, en donde el tratamiento con interferencia por el ARN (iARN) es patisirán o revusirán.

117. El método de la reivindicación 112, en donde el degradador amiloide es 4' - yodo-4' -desoxidoxorrubicina (IDOX), doxiciclina, ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA), ciclodextrina (CyD) o un anticuerpo anti-SAP.

25        118. El método de la reivindicación 117, en donde los degradadores amiloides son doxiciclina combinada con ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA).

119. El método de la reivindicación 112, en donde el sujeto fue diagnosticado con amiloidosis ATTR.

30        120. El método de la reivindicación 112, en donde el sujeto tiene miocardiopatía ATTR sin mutaciones.

121. El método de la reivindicación 112, en donde el sujeto tiene miocardiopatía ATTR hereditaria.

122. El método de la reivindicación 112 o 121, en donde el sujeto tiene polineuropatía ATTR hereditaria.

5           123. El método de la reivindicación 112, en donde el sujeto tiene afectación cardíaca por ATTR.

124. El método de la reivindicación 112, en donde el sujeto tiene afectación de neuropatía periférica por amiloidosis ATTR.

10           125. El método de la reivindicación 112, en donde la formulación farmacéutica, la forma reconstituida de la formulación liofilizada o la forma reconstituida de la formulación de anticuerpo liofilizada se administra al sujeto por vía intravenosa en forma diluida.

126. El método de la reivindicación 125, en donde el diluyente para la forma diluida es solución salina normal.

15           127. El método de la reivindicación 126, en donde el volumen total de la forma diluida administrada al sujeto es al menos alrededor de 100 mL.

128. El método de la reivindicación 127, en donde el volumen total de la forma diluida administrada al sujeto es al menos alrededor de 250 mL.

129. El método de la reivindicación 128, en donde el volumen total de la forma diluida administrada al sujeto es al menos alrededor de 500 mL.

20           130. El método de la reivindicación 128, en donde el volumen total es alrededor de 250 mL.

131. El método de la reivindicación 125, en donde 0,1, 0,2, 0,3, 1, 3, 10 o 30 mg/kg del anticuerpo se administra al sujeto alrededor de una vez cada 28 días.

25           132. El método de la reivindicación 131, en donde 0,1, 0,2, 0,3, 1 o 3 mg/kg del anticuerpo se administra al sujeto como una infusión en un intervalo de alrededor de 60 a 120 minutos.

133. El método de la reivindicación 131, en donde 10 o 30 mg/kg del anticuerpo se administran al sujeto como una infusión en un intervalo de alrededor de 90 a 180 minutos.

30           134. El método de la reivindicación 125, en donde se premedica al sujeto con un antihistamínico.

135. El método de la reivindicación 125, en donde se administra al sujeto

difenhidramina en un intervalo de alrededor de 30 a 90 minutos antes de la administración del anticuerpo.

136. El método de la reivindicación 135, en donde se administra al sujeto paracetamol en un intervalo de alrededor de 30 a 90 minutos antes de la administración del anticuerpo.

5 137. El método de la reivindicación 112, en donde la duración del esquema es al menos 3 meses.

138. El método de la reivindicación 137, en donde la duración del esquema es al menos 12 meses.

**RESUMEN**

La invención proporciona formulaciones de anticuerpo y métodos útiles para la profilaxis o el tratamiento de la amiloidosis mediada por transtirretina.