

FORMULACIONES DE L-ASPARAGINASA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA

[0001] La presente solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de la solicitud de patente provisional estadounidense N.º 63/171.429, presentada el 6 de abril de 2021, cuya divulgación se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

PRESENTACIÓN DE LISTADO DE SECUENCIAS EN ARCHIVO DE TEXTO ASCII

[0002] El contenido de la siguiente presentación en un archivo de texto ASCII se incorpora en la presente por referencia en su totalidad: un formulario legible por computadora (CRF) del Listado de secuencias (nombre del archivo: 210463000300SEQLIST.TXT, fecha de registro: 5 de abril de 2021, tamaño: 3 KB).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] Las proteínas con actividad de L-asparagina aminohidrolasa, comúnmente conocidas como L-asparaginasas, se han utilizado con éxito para el tratamiento de diversas enfermedades potencialmente mortales, que incluyen tipos de cáncer tales como leucemia linfoblástica aguda (ALL) y linfoma linfoblástico (LBL), para los cuales los niños constituyen una gran proporción de los pacientes afectados por estas enfermedades.

[0004] Las L-asparaginasas de origen bacteriano tienen un alto potencial inmunógeno y antigénico. Actualmente disponibles en el mercado, como tratamiento de primera línea, se encuentran la L-asparaginasa y la pegaspargasa derivadas de *E. coli*. Estos productos pueden provocar reacciones adversas de hipersensibilidad, que incluyen reacciones alérgicas, inactivación silenciosa y choque anafiláctico en los pacientes. Los pacientes que padecen reacciones de hipersensibilidad a estos productos a menudo tienen que suspender el tratamiento, lo que da lugar a un peor pronóstico y tasas de supervivencia. Estos pacientes han recurrido a Erwinaze® después de padecer reacciones de hipersensibilidad. Erwinaze® lleva años plagado de problemas de suministro: según se informa, la preparación puede tardar 9 meses (ver, por ejemplo, "Saving Ava: When a cancer drug shortage imperiled a toddler, her mom got to work", *Stat News*, Karen Weintraub (31 de octubre de 2016); Asparaginase Erwinia Chrysanthemi Drug Shortage, *Drugs.com*). Incluso en la actualidad los problemas persisten y la escasez de Erwinaze® es común. La FDA ha emitido cartas de advertencia al fabricante afirmando que "los cambios en el material de inicio o en la línea celular tienen un potencial sustancial para afectar de manera adversa la

identidad, concentración, calidad, pureza o potencia de Erwinase®".

[0005] Existe la necesidad de opciones de tratamientos inmunológicamente no cruzados. Una L-asparaginasa (como L-asparaginasa producida de manera recombinante en *Pseudomonas fluorescens*) sin reactividad cruzada inmunológica con la asparaginasa derivada de *E. coli* abordaría una necesidad médica importante (como componente de un régimen quimioterapéutico de múltiples agentes) para pacientes con ALL/linfoma linfoblástico (LBL), al ayudar a garantizar la disponibilidad de una asparaginasa para los pacientes que han desarrollado hipersensibilidad a la asparaginasa derivada de *E. coli*.

[0006] Actualmente, Erwinase® se suministra como un polvo blanco liofilizado estéril en viales. Cada vial contiene 10,000 unidades internacionales de asparaginasa *Erwinia chrysanthemi*, y los siguientes ingredientes inactivos: monohidrato de glucosa (5,0 mg), cloruro de sodio (0,5 mg). La disponibilidad de formulaciones no liofilizadas elimina la necesidad de rehidratación antes de la administración a un sujeto, por ejemplo, un ser humano. Con ese fin, Oncaspar®, una opción de tratamiento alternativa, no liofilizada, se suministra como una solución isotónica estéril, transparente, incolora y sin conservantes en solución salina amortiguada con fosfato, pH 7,3. Cada mililitro contiene 750 ± 150 unidades internacionales de pegaspargasa, fosfato de sodio dibásico, USP (5,58 mg), fosfato de sodio monobásico, USP, (1,20 mg) y cloruro de sodio, USP (8,50 mg) en agua para inyección, USP. Además, ASPARLAS®, otra alternativa no liofilizada, se suministra como una solución isotónica estéril, transparente, incolora y sin conservantes en solución salina amortiguada con fosfato, pH 7,3, que requiere dilución antes de la infusión intravenosa. Cada vial de ASPARLAS® contiene 3,750 unidades en 5 ml de solución. Cada mililitro contiene 750 unidades de calaspargasa pegol-mknl; fosfato de sodio dibásico, USP (5,58 mg); fosfato de sodio monobásico, USP (1,20 mg); y cloruro de sodio, USP (8,50 mg) en agua para inyección, USP. Sin embargo, aunque existen formulaciones no liofilizadas (tales como Oncaspar® y ASPARLAS®), existen problemas con la estabilidad: por ejemplo, las formulaciones existentes deben utilizarse dentro de las 48 horas si se almacenan a temperatura ambiente.

[0007] Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de formulaciones acuosas estables y no liofilizadas de L-asparaginasa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0008] En la presente se proporcionan formulaciones acuosas no liofilizadas de L-asparaginasa. En algunos aspectos, tales formulaciones pueden ser útiles en el

tratamiento de una o más enfermedades, trastornos o afecciones tratables mediante la reducción de, que incluye, por ejemplo, tipos de cáncer tales como leucemia linfoblástica aguda (ALL) y linfoma linfoblástico (LBL), que incluyen ALL recidivante y LBL recidivante.

[0009] En un aspecto, se proporciona en la presente una formulación acuosa no liofilizada, que comprende:

- (i) una L-asparaginasa, en donde la L-asparaginasa comprende cuatro unidades monoméricas, en donde cada unidad monomérica tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 70 % idéntica a SEQ ID NO: 1; y
- (ii) uno o más estabilizantes, o uno o más amortiguadores, o cualquier combinación de estos.

[0010] En algunas formas de realización, el uno o más estabilizantes comprenden uno o más disacáridos, uno o más sorbitoles, uno o más aminoácidos o cualquier combinación de estos. En algunas formas de realización, el uno o más disacáridos comprenden trehalosa, sacarosa o cualquier combinación de estas. En algunas formas de realización, el uno o más disacáridos comprenden trehalosa. En algunas formas de realización, el uno o más amortiguadores están sustancialmente libres de aminoácidos. En algunas formas de realización, el uno o más amortiguadores comprenden un amortiguador de fosfato, un amortiguador de acetato o cualquier combinación de estos. En algunas formas de realización, el uno o más amortiguadores comprenden un amortiguador de fosfato. En algunas formas de realización, el uno o más amortiguadores comprenden fosfato de sodio. En algunas formas de realización, el fosfato de sodio es fosfato de sodio dibásico anhidro, fosfato de sodio monobásico monohidrato o una combinación de estos. En algunas formas de realización, la formulación comprende además cloruro de sodio. En algunas formas de realización, la formulación comprende además uno o más excipientes. En algunas formas de realización, el uno o más excipientes comprenden polisorbato 80, polisorbato 20, poloxámero 188 o cualquier combinación de estos. En algunas formas de realización, la formulación tiene un pH de entre alrededor de 4,0 y alrededor de 8,5. En algunas formas de realización, la L-asparaginasa está presente a una concentración de alrededor de 20 mg/ml. En algunas formas de realización, la L-asparaginasa no está PEGilada ni PASilada.

[0011] En algunas formas de realización, la formulación comprende menos de alrededor de 0,6 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del

almacenamiento a 40 °C durante dos meses. En algunas formas de realización, la formulación comprende menos de alrededor de 0,6 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana. En algunas formas de realización, la formulación comprende menos de 2 % de especies de alto peso molecular (HMW) después del almacenamiento a 40 °C durante dos meses.

[0012] En un aspecto, se proporciona en la presente una formulación acuosa no liofilizada, que comprende:

(i) una L-asparaginasa, en donde la L-asparaginasa comprende cuatro unidades monoméricas, en donde cada unidad monomérica tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 % idéntica a SEQ ID NO: 1;

(ii) uno o más disacáridos, en donde el uno o más disacáridos comprenden trehalosa, sacarosa o cualquier combinación de estas; y

(iii) uno o más amortiguadores, en donde el uno o más amortiguadores están sustancialmente libres de aminoácidos,

en donde la formulación comprende menos de alrededor de 5 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana.

[0013] En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para tratar una enfermedad, afección o trastorno que se puede tratar mediante la reducción de asparagina en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto cualquiera de las formulaciones descritas en la presente.

[0014] En otro aspecto, se proporciona en la presente una forma de dosis unitaria, que comprende: (i) cualquiera de las formulaciones descritas en la presente; y (ii) uno o más excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico.

[0015] En otro aspecto, se proporciona en la presente un kit, que comprende: (i) cualquiera de las formulaciones descritas en la presente; y (ii) instrucciones para tratar una enfermedad, afección o trastorno que se puede tratar mediante la reducción de asparagina en un sujeto que lo necesite.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

DEFINICIONES

[0016] "Sujeto" se refiere a mamíferos e incluye seres humanos y mamíferos no humanos. Ejemplos de individuos incluyen, entre otros, ratones, ratas, hámsteres, cobayos, cerdos, conejos, gatos, perros, cabras, ovejas, vacas y seres humanos. En algunas formas de realización, sujeto se refiere a un ser humano.

[0017] Los artículos "un" y "una", como se usa, en la presente y en las

reivindicaciones adjuntas se utilizan para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A modo de ejemplo, "un amortiguador" significa un amortiguador o más de un amortiguador.

[0018] Como se usa en la presente, "alrededor de" un parámetro o valor incluye y describe ese parámetro o valor *per se*. Por ejemplo, "alrededor de X" incluye y describe X *per se*. Como se usa en la presente, la expresión "alrededor de" que modifica, por ejemplo, las dimensiones, volúmenes, cantidad de un ingrediente en una composición, concentraciones, temperatura de proceso, tiempo de proceso, rendimientos, velocidades de flujo, presiones y valores similares, y rangos de estos, se refiere se refiere a una variación en la cantidad numérica que puede ocurrir, por ejemplo, a través de procedimientos típicos de medición y manipulación utilizados para elaborar compuestos, composiciones, concentrados o formulaciones de uso; a través de diferencias en la elaboración, fuente o pureza de los materiales de inicio o ingredientes utilizados para llevar a cabo los métodos; y consideraciones similares. La expresión "alrededor de" también abarca cantidades que difieren debido al envejecimiento de, por ejemplo, una composición, formulación o cultivo celular con una concentración o mezcla inicial particular, y cantidades que difieren debido a la mezcla o procesamiento de una composición o formulación con una concentración o mezcla inicial particular. Estén o no modificadas por la expresión "alrededor de", las reivindicaciones adjuntas a la presente incluyen equivalentes de estas cantidades. La expresión "alrededor de" puede referirse además a un rango de valores que sean similares al valor de referencia indicado. En ciertas formas de realización, la expresión "alrededor de" se refiere a un rango de valores que se encuentran dentro de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 por ciento o menos del valor de referencia indicado.

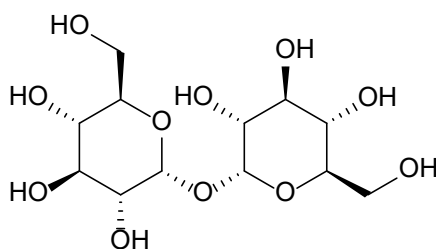
[0019] Como se usa en la presente, la expresión "tratables mediante la reducción de asparagina" se refiere a una enfermedad, afección o trastorno en donde las células implicadas o responsables de la enfermedad, afección o trastorno carecen o tienen una capacidad reducida para sintetizar L-asparagina. La reducción o la privación de L-asparagina puede ser parcial o sustancialmente completa (por ejemplo, hasta niveles que sean indetectables a través del uso de métodos y aparatos conocidos en la técnica).

[0020] La expresión "que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1" significa que la secuencia de aminoácidos de la proteína puede no limitarse estrictamente a SEQ ID NO: 1, pero puede contener aminoácidos adicionales.

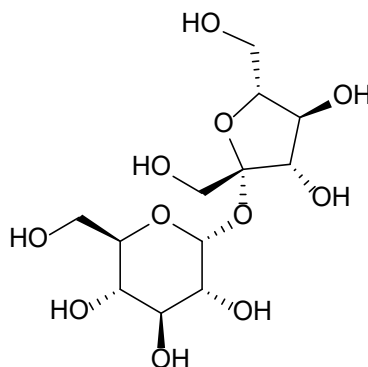
[0021] "Especies de bajo peso molecular" o "especies de LMW", como se usa en la presente, se refieren a especies que tienen un peso molecular menor que el de la L-asparaginasa. En algunas formas de realización, las especies de LMW tienen un peso molecular que es menos de alrededor de 100 %, menos de alrededor de 90 %, menos de alrededor de 80 %, menos de alrededor de 70 %, menos de alrededor de 60 %, menos de alrededor de 50 %, menos de alrededor de 45 %, menos de alrededor de 40 %, menos de alrededor de 35 %, menos de alrededor de 30 %, menos de alrededor de 25 %, menos de alrededor de 20 %, menos de alrededor de 15 %, menos de alrededor de 10 %, menos de alrededor de 5 %, menos de alrededor de 2 %, o menos de alrededor de 1 % del peso molecular de L-asparaginasa. En algunas formas de realización, las especies de LMW se forman mediante la degradación o descomposición de L-asparaginasa, por ejemplo, a través de la hidrólisis de uno o más enlaces covalentes en la L-asparaginasa.

[0022] "Especies de alto peso molecular" o "especies de HMW", como se usa en la presente, se refiere a especies que tienen un peso molecular mayor que el de la L-asparaginasa. En algunas formas de realización, las especies de HMW tienen un peso molecular que es mayor de alrededor de 100 %, mayor de alrededor de 150 %, mayor de alrededor de 200 %, mayor de alrededor de 250 %, mayor de alrededor de 300 %, mayor de alrededor de 350 %, mayor de alrededor de 400 %, mayor de alrededor de 450 %, o mayor de alrededor de 500 % del peso molecular de L-asparaginasa.

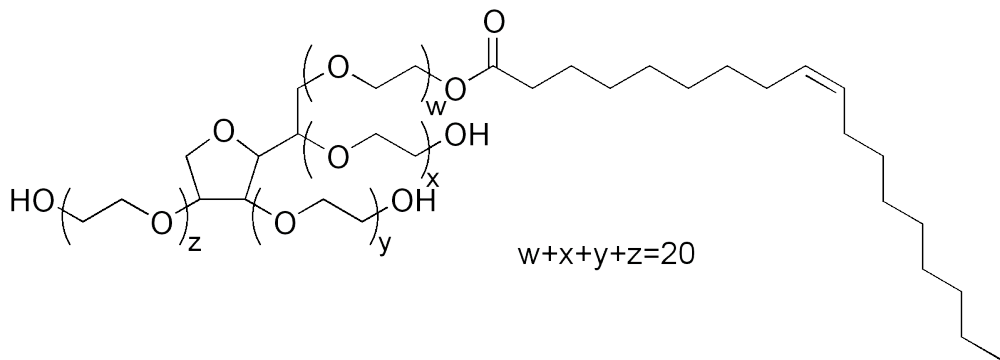
[0023] "Trehalosa" se refiere a un disacárido que tiene la siguiente estructura:



[0024] "Sacarosa" se refiere a un disacárido que tiene la siguiente estructura:



[0025] "Polisorbato 80" o "PS-80" se refiere a un excipiente que tiene la siguiente estructura:



[0026] "PEGilada", como se usa en la presente, se utiliza para describir una estructura o porción a la que se conjuga o se une PEG (polietilenglicol). Se puede unir cualquier cantidad adecuada de unidades de PEG de cualquier manera adecuada (por ejemplo, a través de uno o más enlaces covalentes) y en cualquier ubicación adecuada de la estructura o porción en cuestión. Por ejemplo, a "L-asparaginasa PEGilada" indica una L-asparaginasa a la que se han conjugado o unido una o más unidades de PEG. En consecuencia, una porción "no PEGilada" es aquella a la que no se ha conjugado ni unido PEG.

[0027] "PASilación", como se usa en la presente, se utiliza para describir una estructura o porción a la que se conjugan una o más unidades polipeptídicas que comprenden prolina, alanina o serina o cualquier combinación de estas. Se puede unir cualquier cantidad adecuada de tales unidades polipeptídicas de cualquier manera adecuada (por ejemplo, a través de uno o más enlaces covalentes) y en cualquier ubicación adecuada de la estructura o porción en cuestión. Por ejemplo, a "L-asparaginasa PASilada" indica una L-asparaginasa a la que se han conjugado o unido una o más unidades polipeptídicas que comprende prolina, alanina, o serina o cualquier combinación de estas. En consecuencia, una porción "no PASilada" es aquella a la que no se han conjugado o unido una o más unidades polipeptídicas que comprende prolina, alanina, o serina o cualquier combinación de estas.

[0028] "SEQ ID NO: 1" es la siguiente:

```
ADKLPNIVILATGGTIAGSAATGTQTTGYKAGALGVDTLINAVPEVKKLANVKGEQFSN
MASENMTGDVVLKLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDVVEESAYFLHLTVKSDKPVV
FVAAMRPATAISADGPMNLLAVRVAGDKQSRGRGVMVVLNDRIGSARYITKTNASTL
DTFKANEEGYLGVIIGNRIYYQNRIDKLHTTRSVFDVRGLTSLPKVDILYGYQDDPEYLY
DAAIQHGVKGIVYAGMGAGSVSVRGIAGMRKAMEKGVVVIRSTRTGNGIVPPDEELP
GLVSDSLNPAHARILLMLALTRTSDPKVIEYFHTY.
```

FORMULACIONES

[0029] En un aspecto, se proporciona en la presente una formulación acuosa no liofilizada, que comprende: (i) una L-asparaginasa, en donde la L-asparaginasa comprende cuatro unidades monoméricas, en donde cada unidad monomérica tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 70 % idéntica a SEQ ID NO: 1; y (ii) uno o más estabilizantes, o uno o más amortiguadores o cualquier combinación de estos.

[0030] En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa comprende uno o más estabilizantes. En algunas formas de realización, el uno o más estabilizantes comprenden uno o más disacáridos, uno o más sorbitoles, uno o más aminoácidos o cualquier combinación de estos. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa comprende uno o más disacáridos. En algunas formas de realización, el uno o más disacáridos comprenden trehalosa, sacarosa o cualquier combinación de estas. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa comprende uno o más amortiguadores. En algunas formas de realización, el uno o más amortiguadores, en donde el uno o más amortiguadores están sustancialmente libres de aminoácidos. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa comprende uno o más estabilizantes y uno o más amortiguadores. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa comprende menos de alrededor de 0,6 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 40 °C durante dos meses. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa comprende menos de 2 % de especies de alto peso molecular (HMW) después del almacenamiento a 40 °C durante dos meses. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa comprende menos de alrededor de 0,6 % de especies de bajo peso molecular (LMW) y menos del 2 % de especies de alto peso molecular (HMW) después del almacenamiento a 40 °C durante dos meses. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa comprende menos de alrededor de 0,6 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana.

[0031] En un aspecto, se proporciona en la presente una formulación acuosa no liofilizada, que comprende: (i) una L-asparaginasa, en donde la L-asparaginasa comprende cuatro unidades monoméricas, en donde cada unidad monomérica tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 % idéntica a SEQ ID NO: 1; (ii) uno o más disacáridos, en donde el uno o más disacáridos comprenden

trehalosa, sacarosa o cualquier combinación de estas; y (iii) uno o más amortiguadores, en donde el uno o más amortiguadores están sustancialmente libres de aminoácidos, en donde la formulación comprende menos de alrededor de 5 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana.

[0032] En un aspecto, una L-asparaginasa de acuerdo con la divulgación proporcionada en la presente es una L-asparaginasa recombinante. En un aspecto adicional, una L-asparaginasa de acuerdo con la invención descrita en la presente es una enzima con actividad de L-asparagina aminohidrolasa. La actividad enzimática de tal L-asparaginasa puede incluir no solo la desamidación de asparagina a ácido aspártico y amoníaco, sino también la desamidación de glutamina a ácido glutámico y amoníaco.

[0033] En algunas formas de realización, una L-asparaginasa como se divulga en la presente está activa como multímero. En algunas formas de realización, la L-asparaginasa es una enzima activa como tetrámero. Un tetrámero está compuesto por cuatro subunidades (también conocidas como monómeros). En algunas formas de realización, una L-asparaginasa es un tetrámero que consiste en cuatro subunidades idénticas de 35 kD. En algunas formas de realización, la L-asparaginasa es una proteína terapéutica tetramérica sin puente de disulfuro. En una forma de realización particular, cada una de las subunidades o monómeros de una L-asparaginasa multimérica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

[0034] En una forma de realización particular, cada una de las subunidades o monómeros de una L-asparaginasa tetramérica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En otra forma de realización, la L-asparaginasa es de *Erwinia chrysanthemi* NCPPB 1066 (N.º de acceso de GenBank CAA32884, incorporado en la presente por referencia en su totalidad), con o sin péptidos señal y/o secuencias líder.

[0035] En algunas formas de realización, la L-asparaginasa está compuesta por múltiples subunidades, por ejemplo, cuatro subunidades o monómeros (tetrámero). Una proteína modificada correspondiente puede entonces consistir en, por ejemplo, de 1 a 20 (o más) péptidos conjugados con cada uno de los monómeros de ese tetrámero. En algunas formas de realización, la L-asparaginasa comprende un monómero y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, y 20 (o más) péptidos conjugados con cada uno de los monómeros de L-asparaginasa. En una forma de realización específica, la L-asparaginasa es un multímero que comprende

múltiples subunidades o monómeros, tales como un tetrámero, y cada uno de los monómeros en ese tetrámero está conjugado con 1 péptido, lo que da como resultado un tetrámero que comprende 4 péptidos conjugados, uno para cada monómero. En algunas formas de realización, la L-asparaginasa es un tetrámero que comprende 1-4 péptidos conjugados con cada uno de los monómeros.

[0036] En algunas formas de realización, la L-asparaginasa es un tetrámero que comprende 4-20 péptidos conjugados con cada uno de los monómeros de L-asparaginasa. En algunas formas de realización, la L-asparaginasa tetramérica es un tetrámero que comprende 6-18 péptidos conjugados con cada uno de los monómeros. En algunas formas de realización, la L-asparaginasa es un tetrámero que comprende 6-18 péptidos conjugados con cada uno de los monómeros. En algunas formas de realización, la L-asparaginasa es un tetrámero que comprende 10-15 péptidos conjugados con cada uno de los monómeros.

[0037] En un aspecto, la invención se refiere a una proteína modificada que tiene una L-asparaginasa y múltiples secuencias de péptidos unidas químicamente. En un aspecto adicional, la longitud de las secuencias de péptidos es de alrededor de 10 a alrededor de 100, de alrededor de 15 a alrededor de 60 o de alrededor de 20 a alrededor de 40.

[0038] Fragments de L-asparaginasa, preferentemente fragmentos de la L-asparaginasa de SEQ ID NO: 1, puede ser útil en la invención descrita en la presente. La expresión "un fragmento de L-asparaginasa" (por ejemplo, un fragmento de la L-asparaginasa de SEQ ID NO: 1) significa que la secuencia de la L-asparaginasa puede incluir menos aminoácidos que en las L-asparaginasas ejemplificadas en la presente (por ejemplo, la L-asparaginasa de SEQ ID NO: 1) pero todavía suficientes aminoácidos para conferir actividad de L-aminohidrolasa. Por ejemplo, un "fragmento de L-asparaginasa" es un fragmento que es/consiste en al menos alrededor de 150 o 200 aminoácidos contiguos de una de las L-asparaginasas ejemplificadas en la presente (por ejemplo, la L-asparaginasa de SEQ ID NO: 1) (por ejemplo, alrededor de 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 321, 322, 323, 324, 325 o 326 aminoácidos contiguos) y/o en donde dicho fragmento tiene hasta 50 aminoácidos eliminados del terminal N de dichas L-asparaginasas ejemplificadas en la presente (por ejemplo, la L-asparaginasa de SEQ ID NO: 1) (por ejemplo, hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50) y/o tiene hasta 75 o 100 aminoácidos eliminados del terminal C de dichas L-asparaginasas ejemplificadas en la presente (por ejemplo, la L-asparaginasa

tetramérica de SEQ ID NO: 1) (por ejemplo, hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100) y/o tiene aminoácidos eliminados tanto en el terminal N como en el terminal C de dichas L-asparaginasas ejemplificadas en la presente (por ejemplo, la L-asparaginasa de SEQ ID NO: 1), en donde la cantidad total de aminoácidos eliminados puede ser de hasta 125 o 150 aminoácidos.

[0039] De hecho, una persona del oficio de nivel medio entenderá cómo seleccionar y diseñar proteínas homólogas que conserven sustancialmente su actividad de L-asparaginasa. En general, se utiliza un ensayo de Nessler para la determinación de la actividad de la L-asparaginasa de acuerdo con un método descrito por (Mashburn, L., y Wriston, J. (1963) "Tumor Inhibitory Effect of LAsparaginase", Biochem Biophys Res Commun 12, 50, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad).

[0040] En la técnica se conoce que un polipéptido puede modificarse mediante la sustitución, inserción, eliminación y/o adición de uno o más aminoácidos a la vez que conserva su actividad enzimática. La expresión "uno o más aminoácidos" en este contexto puede referirse a uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más aminoácidos. Por ejemplo, la sustitución de un aminoácido en una posición determinada por un aminoácido químicamente equivalente que no afecta las propiedades funcionales de una proteína es común. Las sustituciones pueden definirse como intercambios dentro de uno de los siguientes grupos: Pequeños residuos alifáticos, apolares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly; Polar, residuos con carga negativa y sus amidas: Asp, Asn, Glu, Gln; Polar, residuos con carga positiva: His, Arg, Lys; residuos alifáticos grandes, no polares: Met, Leu, Ile, Val, Cys; residuos aromáticos grandes: Phe, Tyr, Trp.

[0041] Por lo tanto, se puede esperar que los cambios que dan como resultado la sustitución de un residuo con carga negativa por otro (tal como ácido glutámico por ácido aspártico) o un residuo con carga positiva por otro (tal como lisina por arginina) produzcan un producto funcionalmente equivalente.

[0042] Las posiciones en las que se modifican los aminoácidos y la cantidad de aminoácidos que pueden modificarse en la secuencia de aminoácidos no están particularmente limitadas. Las personas del oficio de nivel medio son capaces de reconocer las modificaciones que se pueden introducir sin afectar la actividad de la proteína. Por ejemplo, se puede esperar que las modificaciones en la porción del terminal N o C de una proteína no alteren la actividad de una proteína en ciertas circunstancias. Con respecto a las asparaginasas, en particular, se ha realizado

mucha caracterización, particularmente con respecto a las secuencias, estructuras y residuos que forman el sitio catalítico activo. Esto proporciona orientación con respecto a los residuos que pueden modificarse sin afectar la actividad de la enzima. Todas las L-asparaginasas conocidas de origen bacteriano tienen características estructurales comunes. Todos son homotetrámeros con cuatro sitios activos entre los dominios de terminal N y C de dos monómeros adyacentes (Aghaipoor (2001) *Biochemistry* 40, 5655-5664, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad). Todos tienen un alto grado de similitud en sus estructuras terciarias y cuaternarias (Papageorgiou (2008) *FEBS J.* 275, 4306-4316, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad). Las secuencias de los sitios catalíticos de las L-asparaginasas están altamente conservadas entre L-asparaginasa II de *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora*, y *E. coli* (Id). El bucle flexible del sitio activo contiene los residuos de los aminoácidos 14-33 y el análisis estructural muestra que Thr15, Thr95, Ser62, Glu63, Asp96, y Ala20 entran en contacto con el ligando (Id). Aghaipoor *et al.* han realizado un análisis detallado de los cuatro sitios activos de L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* al examinar estructuras cristalinas de alta resolución de la enzima en complejo con sus sustratos (Aghaipoor (2001) *Biochemistry* 40, 5655-5664). Kotzia *et al.* proporcionan secuencias para L-asparaginasas de diversas especies y subespecies de *Erwinia* y, y, aunque las proteínas tienen solamente alrededor de 75-77 % de identidad entre *Erwinia chrysanthemi* y *Erwinia carotovora*, cada una de ellas todavía tiene actividad de L-asparaginasa (Kotzia (2007) *J. Biotechnol.* 127, 657-669). Moola *et al.* llevaron a cabo estudios de mapeo de epítopos de la L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* 3937 y pudieron retener la actividad enzimática incluso después de mutar diversas secuencias antigénicas en un intento de reducir la inmunogenicidad de la asparaginasa (Moola (1994) *Biochem. J.* 302, 921-927). En vista de la extensa caracterización que se ha llevado a cabo en L-asparaginasas, una persona del oficio de nivel medio podría determinar cómo realizar fragmentos y/o sustituciones de secuencias y aún mantener la actividad enzimática.

[0043] Más específicamente, los fragmentos de la proteína de SEQ ID NO: 1 también están comprendidos dentro de la definición de la proteína utilizada en la L-asparaginasa de la invención. La expresión "un fragmento de SEQ ID NO: I" significa que la secuencia del polipéptido puede incluir menos aminoácidos que la SEQ ID NO: 1 de longitud completa, pero retiene suficiente proteína para conferir actividad de L-aminohidrolasa. En algunas formas de realización, una L-asparaginasa tiene al menos alrededor de 80 % de homología o identidad con la proteína que comprende SEQ ID

NO: 1.

[0044] En algunas formas de realización, la L-asparaginasa de la formulación comprende cuatro unidades monoméricas, en donde cada unidad monomérica tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 % idéntica a SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, cada unidad monomérica tiene secuencias de aminoácidos que son al menos alrededor de 70 %, alrededor de 71 %, alrededor de 72 %, alrededor de 73 %, alrededor de 74 %, alrededor de 75 %, alrededor de 76 %, alrededor de 77 %, alrededor de 78 %, alrededor de 79 %, alrededor de 80 %, alrededor de 81 %, alrededor de 82 %, alrededor de 83 %, o alrededor de 84 % idénticas a SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, cada unidad monomérica tiene secuencias de aminoácidos que son al menos alrededor de 85 %, alrededor de 86 %, alrededor de 87 %, alrededor de 88 %, alrededor de 89 %, alrededor de 90 %, alrededor de 91 %, alrededor de 92 %, alrededor de 93 %, alrededor de 94 %, alrededor de 95 %, alrededor de 96 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 %, o alrededor de 99 % idénticas a SEQ ID NO: 1.

[0045] En algunas formas de realización, la L-asparaginasa de la formulación está presente a una concentración de alrededor de 20 mg/ml.

[0046] En algunas formas de realización, la L-asparaginasa de la formulación no está PEGilada. En algunas formas de realización, la L-asparaginasa de la formulación no está PASilada. En algunas formas de realización, la L-asparaginasa de la formulación no está PEGilada ni PASilada.

[0047] En algunas formas de realización, en conjunto con las formas de realización anteriores o siguientes, la formulación de L-asparaginasa comprende uno o más estabilizantes. En algunas formas de realización, en conjunto con las formas de realización anteriores o siguientes, el uno o más estabilizantes comprenden uno o más disacáridos, uno o más sorbitoles, uno o más aminoácidos o cualquier combinación de estos. En algunas formas de realización, en conjunto con las formas de realización anteriores o siguientes, la formulación de L-asparaginasa comprende uno o más amortiguadores. En algunas formas de realización, en conjunto con las formas de realización anteriores o siguientes, el uno o más amortiguadores comprenden acetato, glutamato, citrato, histidina, succinato, fosfato, hidroximetilaminometano (por ejemplo, Tris), o cualquier combinación de estos. En algunas formas de realización, en conjunto con las formas de realización anteriores o siguientes, la formulación de L-asparaginasa comprende uno o más tensioactivos. En algunas formas de realización, en conjunto con las formas de realización anteriores o siguientes, el uno o más tensioactivos

comprenden polisorbato 80 (*por ejemplo*, Tween 80), polisorbato 20 (*por ejemplo*, Tween 20), poloxámero 188 o cualquier combinación de estos. En algunas formas de realización, en conjunto con las formas de realización anteriores o siguientes, la formulación de L-asparaginasa comprende uno o más polioles (*por ejemplo*, manitol y sorbitol), uno o más disacáridos (*por ejemplo*, sacarosa y trehalosa), y uno o más polisacáridos (*por ejemplo*, dextrano 40). En algunas formas de realización, en conjunto con las formas de realización anteriores o siguientes, la formulación de L-asparaginasa comprende cloruro de sodio. En algunas formas de realización, en conjunto con las formas de realización anteriores o siguientes, la formulación de L-asparaginasa comprende uno o más aminoácidos (*por ejemplo*, prolina, glicina y arginina).

[0048] En algunas formas de realización, en conjunto con las formas de realización anteriores o siguientes, la formulación comprende uno o más estabilizantes a una concentración de entre alrededor de 50 mM y alrededor de 300 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más estabilizantes a una concentración de entre alrededor de 75 mM y alrededor de 300 mM, entre alrededor de 100 mM y alrededor de 300 mM, entre alrededor de 125 mM y alrededor de 300 mM, entre alrededor de 150 mM y alrededor de 300 mM, entre alrededor de 175 mM y alrededor de 300 mM, entre alrededor de 200 mM y alrededor de 300 mM, entre alrededor de 225 mM y alrededor de 300 mM, entre alrededor de 250 mM y alrededor de 300 mM, o entre alrededor de 275 mM y alrededor de 300 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más estabilizantes a una concentración de entre alrededor de 50 mM y alrededor de 275 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 250 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 225 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 200 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 175 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 150 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 125 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 100 mM, o entre alrededor de 50 mM y alrededor de 75 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más estabilizantes a una concentración de entre alrededor de 150 mM y alrededor de 275 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más estabilizantes a una concentración de entre alrededor de 150 mM y alrededor de 200 mM, entre alrededor de 150 mM y alrededor de 190 mM, entre alrededor de 150 mM y alrededor de 180 mM, entre 150 mM y alrededor de 170 mM, o entre alrededor de 160 mM y 150 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más estabilizantes a una

concentración de entre alrededor de 160 mM y alrededor de 200 mM, entre alrededor de 170 mM y alrededor de 200 mM, entre alrededor de 180 mM y alrededor de 200 mM, o entre alrededor de 190 mM y alrededor de 200 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más estabilizantes a una concentración de alrededor de 170 mM.

[0049] En algunas formas de realización, el uno o más disacáridos de la formulación comprenden trehalosa. En otras formas de realización, el uno o más disacáridos de la formulación comprenden sacarosa. En algunas formas de realización, el uno o más disacáridos de la formulación comprenden una combinación de trehalosa y sacarosa.

[0050] En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más disacáridos a una concentración de entre alrededor de 50 mM y alrededor de 300 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más disacáridos a una concentración de entre alrededor de 75 mM y alrededor de 300 mM, entre alrededor de 100 mM y alrededor de 300 mM, entre alrededor de 125 mM y alrededor de 300 mM, entre alrededor de 150 mM y alrededor de 300 mM, entre alrededor de 175 mM y alrededor de 300 mM, entre alrededor de 200 mM y alrededor de 300 mM, entre alrededor de 225 mM y alrededor de 300 mM, entre alrededor de 250 mM y alrededor de 300 mM, o entre alrededor de 275 mM y alrededor de 300 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más disacáridos a una concentración de entre alrededor de 50 mM y alrededor de 275 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 250 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 225 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 200 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 175 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 150 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 125 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 100 mM, o entre alrededor de 50 mM y alrededor de 75 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más disacáridos a una concentración de entre alrededor de 150 mM y alrededor de 275 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más disacáridos a una concentración de entre alrededor de 150 mM y alrededor de 200 mM, entre alrededor de 150 mM y alrededor de 190 mM, entre alrededor de 150 mM y alrededor de 180 mM, entre 150 mM y alrededor de 170 mM, o entre alrededor de 160 mM y 150 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más disacáridos a una concentración de entre alrededor de 160 mM y alrededor de 200 mM, entre alrededor de 170 mM y alrededor de 200 mM, entre alrededor de 180 mM y alrededor de 200 mM, o entre alrededor de 190 mM y alrededor de 200 mM. En algunas formas de realización, la

formulación comprende uno o más disacáridos a una concentración de alrededor de 170 mM.

[0051] En algunas formas de realización, la formulación comprende trehalosa a una concentración de entre alrededor de 50 mM y alrededor de 300 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más disacáridos a una concentración de entre alrededor de 75 mM y alrededor de 300 mM, entre alrededor de 100 mM y alrededor de 300 mM, entre alrededor de 125 mM y alrededor de 300 mM, entre alrededor de 150 mM y alrededor de 300 mM, entre alrededor de 175 mM y alrededor de 300 mM, entre alrededor de 200 mM y alrededor de 300 mM, entre alrededor de 225 mM y alrededor de 300 mM, entre alrededor de 250 mM y alrededor de 300 mM, o entre alrededor de 275 mM y alrededor de 300 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende trehalosa a una concentración de entre alrededor de 50 mM y alrededor de 275 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 250 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 225 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 200 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 175 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 150 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 125 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 100 mM, o entre alrededor de 50 mM y alrededor de 75 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende trehalosa a una concentración de entre alrededor de 150 mM y alrededor de 275 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende trehalosa a una concentración de entre alrededor de 150 mM y alrededor de 200 mM, entre alrededor de 150 mM y alrededor de 190 mM, entre alrededor de 150 mM y alrededor de 180 mM, entre 150 mM y alrededor de 170 mM, o entre alrededor de 160 mM y 150 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende trehalosa a una concentración de entre alrededor de 160 mM y alrededor de 200 mM, entre alrededor de 170 mM y alrededor de 200 mM, entre alrededor de 180 mM y alrededor de 200 mM, o entre alrededor de 190 mM y alrededor de 200 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende trehalosa a una concentración de alrededor de 170 mM.

[0052] En algunas formas de realización, el uno o más amortiguadores de la formulación están sustancialmente libres de aminoácidos. En algunas formas de realización, el uno o más amortiguadores de la formulación están sustancialmente libres de histidina o arginina o ambas. En algunas formas de realización, el uno o más amortiguadores de la formulación están sustancialmente libres de histidina. En algunas formas de realización, el uno o más amortiguadores de la formulación comprenden un

amortiguador de fosfato, un amortiguador de acetato o cualquier combinación de estos. En algunas formas de realización, el uno o más amortiguadores comprenden un amortiguador de fosfato. En algunas formas de realización, el uno o más amortiguadores comprenden un amortiguador de acetato. En algunas formas de realización, el uno o más amortiguadores comprenden una combinación de un amortiguador de fosfato y un amortiguador de acetato. En algunas formas de realización, el uno o más amortiguadores comprenden una sal de acetato de un metal alcalino. En algunas formas de realización, el uno o más amortiguadores comprenden una sal de fosfato de un metal alcalino. En algunas formas de realización, el uno o más amortiguadores comprenden fosfato de sodio.

[0053] En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más amortiguadores a una concentración de entre alrededor de 0,5 mM y entre alrededor de 50 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más amortiguadores a una concentración de entre alrededor de 1 mM y alrededor de 50 mM, entre alrededor de 2,5 mM y alrededor de 50 mM, entre alrededor de 5 mM y alrededor de 50 mM, entre alrededor de 10 mM y alrededor de 50 mM, entre alrededor de 15 mM y alrededor de 50 mM, entre alrededor de 20 mM y alrededor de 50 mM, entre alrededor de 25 mM y alrededor de 50 mM, entre alrededor de 30 mM y alrededor de 50 mM, entre alrededor de 35 mM y alrededor de 50 mM, entre alrededor de 40 mM y alrededor de 50 mM, o entre alrededor de 45 mM y alrededor de 50 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más amortiguadores a una concentración de entre alrededor de 0,5 mM y alrededor de 45 mM, entre alrededor de 0,5 mM y alrededor de 40 mM, entre alrededor de 0,5 mM y alrededor de 35 mM, entre alrededor de 0,5 mM y alrededor de 30 mM, entre alrededor de 0,5 mM y 25 mM, entre alrededor de 0,5 mM y alrededor de 20 mM, entre alrededor de 0,5 mM y alrededor de 15 mM, entre alrededor de 0,5 mM y alrededor de 10 mM, entre alrededor de 0,5 mM y alrededor de 5 mM, entre alrededor de 0,5 M y alrededor de 2,5 mM, o entre 0,5 mM y alrededor de 1 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más amortiguadores a una concentración de entre alrededor de 10 mM y alrededor de 30 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más amortiguadores a una concentración de entre alrededor de 15 mM y alrededor de 25 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más amortiguadores a una concentración de alrededor de 20 mM.

[0054] En algunas formas de realización, la formulación comprende fosfato de sodio a

una concentración de entre alrededor de 0,5 mM y entre alrededor de 50 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende fosfato de sodio a una concentración de entre alrededor de 1 mM y alrededor de 50 mM, entre alrededor de 2,5 mM y alrededor de 50 mM, entre alrededor de 5 mM y alrededor de 50 mM, entre alrededor de 10 mM y alrededor de 50 mM, entre alrededor de 15 mM y alrededor de 50 mM, entre alrededor de 20 mM y alrededor de 50 mM, entre alrededor de 25 mM y alrededor de 50 mM, entre alrededor de 30 mM y alrededor de 50 mM, entre alrededor de 35 mM y alrededor de 50 mM, entre alrededor de 40 mM y alrededor de 50 mM, o entre alrededor de 45 mM y alrededor de 50 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende fosfato de sodio a una concentración de entre alrededor de 0,5 mM y alrededor de 45 mM, entre alrededor de 0,5 mM y alrededor de 40 mM, entre alrededor de 0,5 mM y alrededor de 35 mM, entre alrededor de 0,5 mM y alrededor de 30 mM, entre alrededor de 0,5 mM y 25 mM, entre alrededor de 0,5 mM y alrededor de 20 mM, entre alrededor de 0,5 mM y alrededor de 15 mM, entre alrededor de 0,5 mM y alrededor de 10 mM, entre alrededor de 0,5 mM y alrededor de 5 mM, entre alrededor de 0,5 M y alrededor de 2,5 mM, o entre 0,5 mM y alrededor de 1 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende fosfato de sodio a una concentración de entre alrededor de 10 mM y alrededor de 30 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende fosfato de sodio a una concentración de entre alrededor de 15 mM y alrededor de 25 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende fosfato de sodio a una concentración de alrededor de 20 mM.

[0055] En algunas formas de realización, la formulación comprende además una sal de metal alcalino. En algunas formas de realización, la formulación comprende además una sal de haluro. En algunas formas de realización, la formulación comprende además una sal de haluro de un metal alcalino. En algunas formas de realización, la formulación comprende además cloruro de sodio. En algunas formas de realización, la formulación comprende además cloruro de sodio a una concentración de entre alrededor de 25 mM y alrededor de 150 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende además cloruro de sodio a una concentración de entre alrededor de 30 mM y alrededor de 150 mM, entre alrededor de 40 mM y alrededor de 150 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 150 mM, entre alrededor de 60 mM y alrededor de 150 mM, entre alrededor de 70 mM y alrededor de 150 mM, entre alrededor de 80 mM y alrededor de 150 mM, entre alrededor de 90 mM y alrededor de 150 mM, entre alrededor de 100 mM y alrededor de 150 mM, entre alrededor de 110 mM y alrededor de 150 mM, entre alrededor de 120 mM y alrededor

de 150 mM, entre alrededor de 130 mM y alrededor de 150 mM, o entre alrededor de 140 mM y alrededor de 150 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende cloruro de sodio a una concentración de entre alrededor de 25 mM y alrededor de 140 mM, entre alrededor de 25 mM y 130 mM, entre alrededor de 25 mM y alrededor de 120 mM, entre alrededor de 25 mM y alrededor de 110 mM, entre alrededor de 25 mM y alrededor de 100 mM, entre alrededor de 25 mM y alrededor de 90 mM, entre alrededor de 25 mM y alrededor de 80 mM, entre alrededor de 25 mM y alrededor de 70 mM, entre alrededor de 25 mM y alrededor de 60 mM, entre alrededor de 25 mM y alrededor de 50 mM, entre alrededor de 25 mM y alrededor de 40 mM, o entre alrededor de 25 mM y 30 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende cloruro de sodio a una concentración de entre alrededor de 30 mM y alrededor de 70 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende cloruro de sodio a una concentración de entre alrededor de 40 mM y alrededor de 60 mM. En algunas formas de realización, la formulación comprende cloruro de sodio a una concentración de alrededor de 50 mM.

[0056] En algunas formas de realización, la formulación comprende además uno o más excipientes. En algunas formas de realización, el uno o más excipientes comprenden uno o más tensioactivos. En algunas formas de realización, el uno o más excipientes comprenden uno o más emulgentes. En algunas formas de realización, el uno o más excipientes se derivan de sorbitán. En algunas formas de realización, el uno o más excipientes comprenden polisorbato 80 (también conocido como PS-80). En algunas formas de realización, el uno o más excipientes comprenden polisorbato 20. En algunas formas de realización, el uno o más excipientes comprenden una combinación de polisorbato 80 y polisorbato 20.

[0057] En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más excipientes a una concentración de no más de alrededor de 0,3 % (p/v). En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más excipientes a una concentración de no más de alrededor de 0,28 % (p/v). En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más excipientes a una concentración de no más de alrededor de 0,26 % (p/v). En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más excipientes a una concentración de no más de alrededor de 0,24 % (p/v). En algunas formas de realización, la formulación comprende uno o más excipientes a una concentración de no más de alrededor de 0,22 % (p/v). En algunas formas de realización, la formulación comprende además uno o más excipientes a una concentración de entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,3 % (p/v). En

algunas formas de realización, la formulación comprende además uno o más excipientes a una concentración de entre alrededor de 0,01 % (p/v) y alrededor de 0,3 % (p/v).

[0058] En algunas formas de realización, la formulación comprende además uno o más excipientes a una concentración de entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v). En algunas formas de realización, la formulación comprende además uno o más excipientes a una concentración de entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,18 % (p/v), entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,16 % (p/v), entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,14 % (p/v), entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,12 % (p/v), entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,1 % (p/v), entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,08 % (p/v), entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,06 % (p/v), entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,04 % (p/v), entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,03 %, entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,025 % (p/v), entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,02 % (p/v), entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,015 % (p/v), o entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,01 % (p/v). En algunas formas de realización, la formulación comprende además uno o más excipientes a una concentración de entre alrededor de 0,01 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,015 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,02 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,025 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,03 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,04 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,05 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,06 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,07 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,08 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,09 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,1 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,12 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,14 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,16 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), o entre alrededor de 0,18 % (p/v) y 0,2 % (p/v). En algunas formas de realización, la formulación comprende además uno o más excipientes a una concentración de entre alrededor de 0,01 % (p/v) y alrededor de 0,03 % (p/v). En algunas formas de realización, la formulación comprende además uno o más excipientes a una concentración de entre alrededor de 0,015 % (p/v) y alrededor de 0,025 % (p/v). En algunas formas de realización, la formulación comprende además uno o más excipientes a una concentración de alrededor de 0,02 % (p/v).

[0059] En algunas formas de realización, la formulación comprende además polisorbato 80 a una concentración de entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v). En algunas formas de realización, la formulación comprende además polisorbato 80 a una concentración de entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,18 % (p/v), entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,16 % (p/v), entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,14 % (p/v), entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,12 % (p/v), entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,1 % (p/v), entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,08 % (p/v), entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,06 % (p/v), entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,04 % (p/v), entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,03 %, entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,025 % (p/v), entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,02 % (p/v), entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,015 % (p/v), o entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,01 % (p/v). En algunas formas de realización, la formulación comprende además polisorbato 80 a una concentración de entre alrededor de 0,01 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,015 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,02 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,025 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,03 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,04 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,05 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,06 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,07 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,08 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,09 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,1 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,12 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,14 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), entre alrededor de 0,16 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), o entre alrededor de 0,18 % (p/v) y 0,2 % (p/v). En algunas formas de realización, la formulación comprende además polisorbato 80 a una concentración de entre alrededor de 0,01 % (p/v) y alrededor de 0,03 % (p/v). En algunas formas de realización, la formulación comprende además polisorbato 80 a una concentración de entre alrededor de 0,015 % (p/v) y alrededor de 0,025 % (p/v). En algunas formas de realización, la formulación comprende además polisorbato 80 a una concentración de alrededor de 0,02 % (p/v).

[0060] En algunas formas de realización, la formulación proporcionada en la presente tiene un pH de entre alrededor de 4,0 y alrededor de 8,5. En algunas formas de realización, la formulación tiene un pH de entre alrededor de 4,5 y alrededor de 8,5, entre alrededor de 5,0 y alrededor de 8,5, entre alrededor de 5,5 y alrededor de 8,5,

entre alrededor de 6,0 y alrededor de 8,5, entre alrededor de 6,5 y alrededor de 8,5, entre alrededor de 7,0 y alrededor de 8,5, entre alrededor de 7,5 y alrededor de 8,5, o entre alrededor de 8,0 y alrededor de 8,5. En algunas formas de realización, la formulación tiene un pH de entre alrededor de 4,5 y alrededor de 8,0, entre alrededor de 4,5 y alrededor de 7,5, entre alrededor de 4,5 y alrededor de 7,0, entre alrededor de 4,5 y alrededor de 6,5, entre alrededor de 4,5 y alrededor de 6,0, entre alrededor de 4,5 y alrededor de 5,5, o entre alrededor de 4,5 y alrededor de 5,0. En algunas formas de realización, la formulación proporcionada en la presente tiene un pH de entre alrededor de 4,0 y alrededor de 8,0, entre alrededor de 4,0 y alrededor de 7,5, entre alrededor de 4,0 y alrededor de 7,0, entre alrededor de 4,0 y alrededor de 6,5, entre alrededor de 4,0 y alrededor de 6,0, entre alrededor de 4,0 y alrededor de 5,5, entre alrededor de 4,0 y alrededor de 5,0, o entre alrededor de 4,0 y alrededor de 4,5. En algunas formas de realización, la formulación proporcionada en la presente tiene un pH de entre alrededor de 5,5 y alrededor de 8,5. En algunas formas de realización, la formulación proporcionada en la presente tiene un pH de entre alrededor de 6,0 y alrededor de 8,0. En algunas formas de realización, la formulación proporcionada en la presente tiene un pH de entre 6,5 y alrededor de 7,5. En algunas formas de realización, la formulación proporcionada en la presente tiene un pH de alrededor de 7,0.

[0061] En algunas formas de realización, junto con las formas de realización anteriores o siguientes, se proporciona en la presente una formulación acuosa no liofilizada, que comprende: (i) una L-asparaginasa, en donde la L-asparaginasa comprende cuatro unidades monoméricas, en donde cada unidad monomérica tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 70 % idéntica a SEQ ID NO: 1; y (ii) uno o más estabilizantes, o uno o más amortiguadores o cualquier combinación de estos. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa comprende uno o más estabilizantes. En algunas formas de realización, el uno o más estabilizantes comprenden uno o más disacáridos, uno o más sorbitoles, uno o más aminoácidos o cualquier combinación de estos. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa comprende uno o más disacáridos. En algunas formas de realización, el uno o más disacáridos comprenden trehalosa, sacarosa o cualquier combinación de estas. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa comprende uno o más amortiguadores. En algunas formas de realización, el uno o más amortiguadores, en donde el uno o más amortiguadores están sustancialmente libres de aminoácidos. En algunas formas de

realización, la formulación de L-asparaginasa comprende menos de alrededor de 0,6 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 40 °C durante dos meses. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa comprende menos de 2 % de especies de alto peso molecular (HMW) después del almacenamiento a 40 °C durante dos meses. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa comprende menos de alrededor de 0,6 % de especies de bajo peso molecular (LMW) y menos del 2 % de especies de alto peso molecular (HMW) después del almacenamiento a 40 °C durante dos meses. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa comprende menos de alrededor de 0,6 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana. En algunas formas de realización, la formulación tiene un pH de entre alrededor de 4,0 y alrededor de 8,5. En algunas formas de realización, la formulación tiene un pH de alrededor de 7,0.

[0062] En algunas formas de realización, junto con las formas de realización anteriores o siguientes, (i) la L-asparaginasa comprende cuatro unidades monoméricas, en donde cada unidad monomérica tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 70 % idéntica a SEQ ID NO: 1; y está presente a una concentración de alrededor de 20 mg/ml; (ii) uno o más estabilizantes (por ejemplo, disacáridos, sorbitoles, aminoácidos o cualquier combinación de estos) a una concentración de entre alrededor de 50 mM y alrededor de 300 mM; (iii) uno o más amortiguadores (por ejemplo, acetato, glutamato, citrato, histidina, succinato, fosfato, hidroximetilaminometano o una combinación de estos) a una concentración de entre alrededor de 0,5 mM y alrededor de 50 mM; (iv) cloruro de sodio, en donde el cloruro de sodio está presente a una concentración de entre alrededor de 25 mM y alrededor de 150 mM; y (v) uno o más tensioactivos (por ejemplo, polisorbato 80, polisorbato 20, poloxámero 188 o cualquier combinación de estos) a una concentración de entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,3 % (p/v). En algunas formas de realización, en conjunto con las formas de realización anteriores o siguientes, la formulación tiene un pH de entre alrededor de 4,0 y alrededor de 8,5. En algunas formas de realización, en conjunto con las formas de realización anteriores o siguientes, la formulación tiene un pH de alrededor de 7,0.

[0063] En algunas formas de realización, en conjunto con las formas de realización anteriores o siguientes, (i) la L-asparaginasa comprende cuatro unidades monoméricas, en donde cada unidad monomérica tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 70 % idéntica a SEQ ID NO: 1; y está

presente a una concentración de alrededor de 20 mg/ml; (ii) trehalosa, en donde la trehalosa está presente a una concentración de entre alrededor de 50 mM y alrededor de 300 mM; (iii) fosfato de sodio, en donde el fosfato de sodio (por ejemplo, dibásico anhidro, monohidrato monobásico o una combinación de estos) está presente a una concentración de entre alrededor de 0,5 mM y alrededor de 50 mM; (iv) cloruro de sodio, en donde el cloruro de sodio está presente a una concentración de entre alrededor de 25 mM y alrededor de 150 mM; y (v) polisorbato 80, en donde el polisorbato 80 está presente a una concentración de entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v).

[0064] En algunas formas de realización, en conjunto con las formas de realización anteriores o siguientes, la L-asparaginasa se puede formular en una forma de dosis unitaria. La expresión "formas de dosis unitaria" se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, en donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de ingrediente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado. En algunas formas de realización, una dosis unitaria puede administrarse cada 12 horas, cada 24 horas, cada 48 horas o cada 72 horas. En algunas formas de realización, una dosis unitaria se administra cada 48 horas. En algunas formas de realización, una dosis unitaria contiene de alrededor de 5 mg a alrededor de 50 mg (por ejemplo, alrededor de 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 11 mg, 12 mg, 13 mg, 14 mg, 15 mg, 16 mg, 17 mg, 18 mg, 19 mg, 20 mg, 21 mg, 22 mg, 23 mg, 24 mg, 25 mg, 26 mg, 27 mg, 28 mg, 29 mg, 30 mg, 31 mg, 32 mg, 33 mg, 34 mg, 35 mg, 36 mg, 37 mg, 38 mg, 39 mg, 40 mg, 41 mg, 42 mg, 43 mg, 44 mg, 45 mg, 46 mg, 47 mg, 48 mg, y 49 mg) de la L-asparaginasa.

[0065] En algunas formas de realización, se proporciona en la presente una formulación acuosa no liofilizada, que comprende: (i) una L-asparaginasa, en donde la L-asparaginasa comprende cuatro unidades monoméricas, en donde cada unidad monomérica tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 % idéntica a SEQ ID NO: 1; (ii) uno o más disacáridos, en donde el uno o más disacáridos comprenden trehalosa, sacarosa o cualquier combinación de estas; (iii) uno o más amortiguadores, en donde el uno o más amortiguadores están sustancialmente libres de aminoácidos; y (iv) cloruro de sodio, en donde la formulación comprende menos de alrededor de 5 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana. En algunas formas de realización, la formulación tiene un pH de entre alrededor de 4,0 y alrededor de 8,5. En

algunas formas de realización, la formulación tiene un pH de alrededor de 7,0.

[0066] En algunas formas de realización, se proporciona en la presente una formulación acuosa no liofilizada, que comprende: (i) una L-asparaginasa, en donde la L-asparaginasa comprende cuatro unidades monoméricas, en donde cada unidad monomérica tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 % idéntica a SEQ ID NO: 1; (ii) uno o más disacáridos, en donde el uno o más disacáridos comprenden trehalosa, sacarosa o cualquier combinación de estas; (iii) uno o más amortiguadores, en donde el uno o más amortiguadores están sustancialmente libres de aminoácidos; y (iv) uno o más excipientes, en donde la formulación comprende menos de alrededor de 5 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana.

[0067] En algunas formas de realización, se proporciona en la presente una formulación acuosa no liofilizada, que comprende: (i) una L-asparaginasa, en donde la L-asparaginasa comprende cuatro unidades monoméricas, en donde cada unidad monomérica tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 % idéntica a SEQ ID NO: 1; (ii) uno o más disacáridos, en donde el uno o más disacáridos comprenden trehalosa, sacarosa o cualquier combinación de estas; (iii) uno o más amortiguadores, en donde el uno o más amortiguadores están sustancialmente libres de aminoácidos; y (iv) cloruro de sodio; y (v) uno o más excipientes, en donde la formulación comprende menos de alrededor de 5 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana. En algunas formas de realización, la formulación tiene un pH de entre alrededor de 4,0 y alrededor de 8,5. En algunas formas de realización, la formulación tiene un pH de alrededor de 7,0.

[0068] En algunas formas de realización, se proporciona en la presente una formulación acuosa no liofilizada, que comprende: (i) una L-asparaginasa, en donde la L-asparaginasa comprende cuatro unidades monoméricas, en donde cada unidad monomérica tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 % idéntica a SEQ ID NO: 1; (ii) uno o más disacáridos, en donde el uno o más disacáridos comprenden trehalosa, sacarosa o cualquier combinación de estas; (iii) uno o más amortiguadores, en donde el uno o más amortiguadores están sustancialmente libres de aminoácidos; y (iv) polisorbato 80, en donde la formulación comprende menos de alrededor de 5 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana. En algunas formas de realización, la formulación tiene un pH de entre alrededor de 4,0 y alrededor de 8,5. En

algunas formas de realización, la formulación tiene un pH de alrededor de 7,0.

[0069] En algunas formas de realización, se proporciona en la presente una formulación acuosa no liofilizada, que comprende: (i) una L-asparaginasa, en donde la L-asparaginasa comprende cuatro unidades monoméricas, en donde cada unidad monomérica tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 % idéntica a SEQ ID NO: 1; (ii) uno o más disacáridos, en donde el uno o más disacáridos comprenden trehalosa, sacarosa o cualquier combinación de estas; (iii) uno o más amortiguadores, en donde el uno o más amortiguadores están sustancialmente libres de aminoácidos; y (iv) cloruro de sodio; y (v) polisorbato 80, en donde la formulación comprende menos de alrededor de 5 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana. En algunas formas de realización, la formulación tiene un pH de entre alrededor de 4,0 y alrededor de 8,5. En algunas formas de realización, la formulación tiene un pH de alrededor de 7,0.

[0070] En algunas formas de realización, se proporciona en la presente una formulación acuosa no liofilizada, que comprende: (i) una L-asparaginasa, en donde la L-asparaginasa comprende cuatro unidades monoméricas, en donde cada unidad monomérica tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 % idéntica a SEQ ID NO: 1; (ii) trehalosa; (iii) fosfato de sodio; y (iv) cloruro de sodio; y (v) polisorbato 80, en donde la formulación comprende menos de alrededor de 5 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana. En algunas formas de realización, la formulación tiene un pH de entre alrededor de 4,0 y alrededor de 8,5. En algunas formas de realización, la formulación tiene un pH de alrededor de 7,0.

[0071] En algunas formas de realización, se proporciona en la presente una formulación acuosa, no liofilizada que comprende: (i) una L-asparaginasa que comprende cuatro unidades monoméricas, en donde cada unidad monomérica tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 % idéntica a SEQ ID NO: 1; y en donde la L-asparaginasa está presente a una concentración de alrededor de 20 mg/ml; (ii) trehalosa, en donde la trehalosa está presente a una concentración de entre alrededor de 50 mM y alrededor de 300 mM; (iii) fosfato de sodio, en donde el fosfato de sodio está presente a una concentración de entre alrededor de 0,5 mM y alrededor de 50 mM; (iv) cloruro de sodio, en donde el cloruro de sodio está presente a una concentración de entre alrededor de 25 mM y alrededor de 150 mM; y (v) polisorbato 80, en donde el polisorbato 80 está presente a una concentración de entre

alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v), en donde la formulación comprende menos de alrededor de 5 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana. En algunas formas de realización, la formulación tiene un pH de entre alrededor de 4,0 y alrededor de 8,5. En algunas formas de realización, la formulación tiene un pH de alrededor de 7,0.

[0072] En algunas formas de realización, se proporciona en la presente una formulación acuosa, no liofilizada que comprende: (i) una L-asparaginasa que comprende cuatro unidades monoméricas, en donde cada unidad monomérica tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 % idéntica a SEQ ID NO: 1; y en donde la L-asparaginasa está presente a una concentración de alrededor de 20 mg/ml; (ii) trehalosa, en donde la trehalosa está presente a una concentración de alrededor de 170 mM; (iii) fosfato de sodio, en donde el fosfato de sodio está presente a una concentración de alrededor de 20 mM; (iv) cloruro de sodio, en donde el cloruro de sodio está presente a una concentración de alrededor de 50 mM; y (v) polisorbato 80, en donde el polisorbato 80 está presente a una concentración de alrededor de 0,02 % (p/v), en donde la formulación comprende menos de alrededor de 5 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana. En algunas formas de realización, la formulación tiene un pH de entre alrededor de 4,0 y alrededor de 8,5. En algunas formas de realización, la formulación tiene un pH de alrededor de 7,0.

[0073] En algunas formas de realización, se proporciona en la presente una formulación como se describe en otra parte en la presente, en donde la formulación comprende menos de alrededor de 5 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana. En algunas formas de realización, la formulación comprende menos de alrededor de 4,5 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana. En algunas formas de realización, la formulación comprende menos de alrededor de 4 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana. En algunas formas de realización, la formulación comprende menos de alrededor de 3,5 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana. En algunas formas de realización, la formulación comprende menos de alrededor de 3 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana. En algunas formas de realización, la formulación comprende menos de alrededor de 2,5 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del

almacenamiento a 37 °C durante una semana. En algunas formas de realización, la formulación comprende menos de alrededor de 2 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana. La formulación comprende menos de alrededor del 1,5 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana. En algunas formas de realización, la formulación comprende menos de alrededor de 1 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana. En algunas formas de realización, la formulación comprende menos de alrededor de 0,5 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana.

[0074] Se debe entender que cada componente y/o característica de las formulaciones descritas en la presente puede estar presente en combinación con cualquier otro componente y/o característica de las formulaciones descritas en la presente, de la misma manera que si todas y cada una de las combinaciones de los componentes y/o las características descritas en la presente se enumeraran de forma individual y específica.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO

[0075] Las formulaciones de L-asparaginasa de la presente divulgación se pueden usar en el tratamiento de una enfermedad en un sujeto (por ejemplo, un ser humano), en donde la enfermedad se puede tratar mediante la reducción de asparagina o la administración de asparaginasa. En algunas formas de realización, el sujeto humano, antes de la administración de la L-asparaginasa, ha padecido una inactivación silenciosa de la asparaginasa derivada de *E. Coli*. En algunas formas de realización, el sujeto, antes de la administración de la L-asparaginasa, ha padecido una reacción alérgica a la asparaginasa derivada de *E. Coli*. En algunas formas de realización, el sujeto, antes de la administración de la L-asparaginasa, ha padecido anafilaxis a la asparaginasa derivada de *E. Coli*. Ejemplos no limitativos de signos objetivos de alergia o hipersensibilidad incluyen la prueba de "anticuerpo positivo" para una enzima asparaginasa.

[0076] En algunas formas de realización, las formulaciones de L-asparaginasa de la presente divulgación son útiles en el tratamiento o la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (ALL). La incidencia de recaída en pacientes con ALL después del tratamiento con L-asparaginasa sigue siendo alta; aproximadamente entre el 10 y el 25 % de los pacientes pediátricos con ALL tienen una recaída temprana (por ejemplo, algunos durante la fase de

mantenimiento entre 30 y 36 meses después de la inducción). Si un paciente tratado con L-asparaginasa derivada de *E. Coli* tiene una recaída, el tratamiento posterior con preparaciones de *E. Coli* podría provocar un efecto de "vacunación", por medio del cual la preparación de *E. Coli* tiene una mayor inmunogenicidad durante las administraciones posteriores. En una forma de realización, la L-asparaginasa de la invención se puede usar en un método para tratar pacientes con ALL recidivante que se trataron previamente con otras preparaciones de asparaginasa, en particular aquellos que se trataron previamente con asparaginasas derivadas de *E. Coli*.

[0077] Las enfermedades o trastornos en los que las formulaciones de L-asparaginasa de la presente divulgación son útiles en el tratamiento incluyen, entre otros, los siguientes: neoplasias o tipos de cáncer, incluidos, entre otros, neoplasias hematológicas, linfoma, linfoma no Hodgkin, linfoma NK, cáncer de páncreas, enfermedad de Hodgkin, linfoma inmunoblástico de células grandes, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia monocítica aguda, leucemia aguda de linfocitos T, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielomonocítica bifenotípica de linfocitos B, leucemia linfocítica crónica, linfoma, reticulosarcoma y melanoma, y linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL). Otras enfermedades o trastornos en los que las formulaciones de L-asparaginasa son útiles en el tratamiento son tipos de cáncer que incluyen, entre otros, carcinoma de células renales, adenocarcinoma de células renales, glioblastoma que incluye glioblastoma multiforme y astrocitoma de glioblastoma, meduloblastoma, rabdomiosarcoma, melanoma maligno, carcinoma epidermoide, carcinoma de células escamosas, carcinoma de pulmón que incluye carcinoma de pulmón de células grandes y carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de endometrio, adenocarcinoma de ovario, tetratocarcinoma de ovario, adenocarcinoma de cuello uterino, carcinoma de mama, adenocarcinoma de mama, carcinoma ductal de mama, adenocarcinoma de páncreas, carcinoma ductal de páncreas, carcinoma de colon, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma colorrectal, carcinoma de células transicionales de vejiga, papiloma de vejiga, carcinoma de próstata, osteosarcoma, carcinoma epiteloide del hueso, carcinoma de próstata y cáncer de tiroides. El tipo de cáncer puede ser un tipo de cáncer sólido, por ejemplo, cáncer de pulmón o cáncer de mama. Las enfermedades hematológicas no malignas representativas que responden a la reducción de la asparagina incluyen enfermedades sanguíneas mediadas por el sistema inmunitario que incluyen, entre otras, enfermedades infecciosas tales como las causadas por la infección por VIH (es decir, SIDA). Las enfermedades no

hematológicas asociadas con la dependencia de la asparagina incluyen enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedades vasculares del colágeno, SIDA, osteoartritis, síndrome de Issac, psoriasis, diabetes mellitus insulínica dependiente, esclerosis múltiple, panencefalitis esclerosante, lupus eritematoso sistémico (SLE), fiebre reumática, enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica activa, glomerulonefritis, miastenia gravis, pénfigo vulgar y enfermedad de Graves. Las células sospechosas de causar enfermedades pueden analizarse para determinar la dependencia de asparagina en cualquier ensayo *in vitro* o *in vivo* adecuado, por ejemplo, un ensayo *in vitro* en donde el medio de crecimiento carece de asparagina.

[0078] En algunas formas de realización, en conjunto con las formas de realización anteriores o siguientes, la enfermedad, afección o trastorno que se puede tratar mediante la reducción de asparagina en un sujeto que lo necesite comprende cáncer colorrectal (CRC) mutado en WNT. En algunas formas de realización, en conjunto con las formas de realización anteriores o siguientes, la enfermedad, afección o trastorno que se puede tratar mediante la reducción de asparagina en un sujeto que lo necesite comprende leucemia mieloide aguda (AML) con recidiva remitente (R/R).

[0079] Las enfermedades o trastornos en los que las formulaciones de L-asparaginasa de la presente divulgación son útiles en el tratamiento incluyen, entre otros, sarcoma, cáncer de mama, cáncer de mama metastásico, cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer colorrectal y cáncer de cabeza y cuello.

Composiciones farmacéuticas y coadministración

[0080] En algunas formas de realización, el tratamiento con una formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se coadministra con un régimen quimioterapéutico de múltiples agentes. En algunas formas de realización, el tratamiento con una formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se coadministra con uno o más agentes quimioterapéuticos como parte de un régimen quimioterapéutico de múltiples agentes. En algunas formas de realización, el tratamiento de pacientes con una formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación además de otros agentes ayuda a garantizar la disponibilidad de una asparaginasa para pacientes que han desarrollado hipersensibilidad a la asparaginasa derivada de *E. Coli*.

[0081] Los ejemplos de agentes que pueden ser parte de un régimen quimioterapéutico de múltiples agentes con una L-asparaginasa de la presente

divulgación incluyen, entre otros: citarabina, vincristina, daunorrubicina, metotrexato, leuovorina, doxorubicina, antraciclina, corticosteroides y glucocorticoides (incluidos, entre otros, prednisona, prednisolona y/o dexametasona), ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, venetoclax y etopósido. En algunas formas de realización, el régimen quimioterapéutico de múltiples agentes es la L-asparaginasa y un agente quimioterapéutico adicional. En algunas formas de realización, el régimen quimioterapéutico de múltiples agentes es la L-asparaginasa y dos o más agentes quimioterapéuticos adicionales.

[0082] Como ejemplo, a los pacientes con ALL se les coadministrará la L-asparaginasa de la presente divulgación junto con una quimioterapia de múltiples agentes durante 3 fases de quimioterapia que incluyen inducción, consolidación o intensificación y mantenimiento. En un ejemplo específico, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se coadministra con un inhibidor de la asparagina sintetasa (por ejemplo, tal como se establece en WO 2007/103290, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad). En otro ejemplo específico, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación no se coadministra con un inhibidor de asparagina sintetasa, sino que se coadministra con otros fármacos de quimioterapia. En otro ejemplo específico, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se coadministra con un inhibidor de asparagina sintetasa y otros fármacos de quimioterapia. La formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se puede coadministrar antes, después o simultáneamente con otros compuestos como parte de un régimen de quimioterapia con múltiples agentes. En una forma de realización particular, la L-asparaginasa de la presente divulgación comprende una proteína producida de forma recombinante en *Pseudomonas fluorescens* y, más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1.

[0083] Las formulaciones divulgadas en la presente pueden administrarse a un paciente como una composición farmacéutica mediante el uso de técnicas estándar. Por lo general, las técnicas y formulaciones se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, 22.^a edición, Mack Publishing, 2015 (incorporada en la presente por referencia).

[0084] Las formas de dosis adecuadas, en parte, dependen del uso o de la vía de entrada, por ejemplo, oral, transdérmica, transmucosa o mediante inyección (parenteral). Tales formas de dosis deben permitir que el agente terapéutico alcance una célula diana o de otro modo tenga el efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, las

composiciones farmacéuticas inyectadas en el torrente sanguíneo son preferentemente solubles. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente divulgación se pueden formular como sales y complejos aceptables desde el punto de vista farmacéutico de estas. Las sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico son sales no tóxicas presentes en las cantidades y concentraciones a las que se administran. La preparación de tales sales puede facilitar el uso farmacéutico al alterar las características físicas del compuesto sin impedir que ejerza su efecto fisiológico. Las alteraciones útiles en las propiedades físicas incluyen disminuir el punto de fusión para facilitar la administración transmucosa y aumentar la solubilidad para facilitar la administración de concentraciones más altas del fármaco. La sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de una proteína modificada como se describe en la presente puede estar presente como un complejo, como apreciarán las personas del oficio de nivel medio. Las sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico incluyen sales de adición de ácidos tales como las que contienen sulfato, clorhidrato, fumarato, maleato, fosfato, sulfamato, acetato, citrato, lactato, tartrato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, ciclohexilsulfamato y quinato. Se pueden obtener sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico a partir de ácidos, que incluyen ácido clorhídrico, ácido maleico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido sulfámico, ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido malónico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido ciclohexilsulfámico, ácido fumárico y ácido quínico. Las sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico también incluyen sales de adición básicas tales como las que contienen benztatina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina, procaína, aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio, amonio, alquilamina y zinc, cuando están presentes grupos funcionales ácidos, tales como ácido carboxílico o fenol. Por ejemplo, ver Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*. Tales sales pueden prepararse mediante el uso de las bases correspondientes apropiadas. También se pueden incorporar portadores y/o excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico en una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para facilitar la administración de la asparaginasa particular. Los ejemplos de portadores adecuados para su uso en la práctica de la invención incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares tales como lactosa, glucosa o sacarosa, o tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales, polietilenglicoles y solventes fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de solventes fisiológicamente

compatibles incluyen soluciones estériles de agua para inyección (WFI), solución salina y dextrosa.

[0085] Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden administrar a través de diferentes vías, que incluyen administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, oral, tópica (transdérmica) o transmucosa. Para la administración oral, por ejemplo, los compuestos se pueden formular en formas de dosis oral convencionales tales como cápsulas, comprimidos y preparaciones líquidas tales como jarabes, elixires y gotas concentradas. Alternativamente, se puede utilizar una inyección (administración parenteral), por ejemplo, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal e inyección subcutánea. Para inyección, las composiciones farmacéuticas se formulan en soluciones líquidas, preferentemente en soluciones o amortiguadores fisiológicamente compatibles, tales como solución salina, solución de Hank o solución de Ringer. En un aspecto específico, la formulación de L-asparaginasa se administra por vía intramuscular. En un aspecto específico, la formulación de L-asparaginasa se administra por vía intravenosa. En un aspecto específico, la formulación de L-asparaginasa se administra por vía subcutánea.

[0086] La administración sistémica también se puede realizar por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, se utilizan en la formulación penetrantes adecuados para permear la barrera. Tales penetrantes son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, sales biliares y derivados de ácido fusídico. Además, se pueden usar detergentes para facilitar la permeación. La administración transmucosa, por ejemplo, puede ser a través de pulverizadores nasales, inhaladores (para administración pulmonar), supositorios rectales o supositorios vaginales. Para la administración tópica, los compuestos se pueden formular en forma de pomadas, ungüentos, geles o cremas, como es conocido en el estado de la técnica.

Dosis

[0087] En algunas formas de realización, una dosis es una cantidad administrada al sujeto humano durante un cierto tiempo y frecuencia. En algunas formas de realización, la dosis de formulación de L-asparaginasa se administrará a un sujeto humano con hipersensibilidad solamente cuando la hipersensibilidad disminuya.

[0088] En una forma de realización de ejemplo, se administra una formulación de L-asparaginasa a un sujeto humano en una cantidad de alrededor de 10 mg/m² a alrededor de 100 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, se administra por

vía intramuscular una formulación de L-asparaginasa cada dos días durante un período de 5 días consecutivos seguido de un período de descanso de 2 días consecutivos, en donde la cantidad es de alrededor de 25 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, se administra por vía intravenosa una formulación de L-asparaginasa cada dos días durante un período de 5 días consecutivos seguido de un período de descanso de 2 días consecutivos, en donde la cantidad es de alrededor de 37,5 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, se administra por vía intravenosa una formulación de L-asparaginasa cada dos días durante un período de 5 días consecutivos seguido de un período de descanso de 2 días consecutivos, en donde la cantidad es de alrededor de 50 mg/m².

[0089] En formas de realización adicionales de ejemplo y de acuerdo con cualquiera de las discusiones en la presente con respecto a la dosis, la formulación de L-asparaginasa administrada en tales dosis no está conjugada con un polímero tal como una porción PEG y/o no está conjugada con un péptido que comprende únicamente alanina y/o residuos de prolina.

1. Cantidad de dosis

[0090] Las cantidades de la formulación de L-asparaginasa a administrarse de la presente divulgación dependerán de muchos factores, por ejemplo, la IC₅₀, la EC₅₀, la semivida biológica del compuesto, la edad, el tamaño, el peso y la condición física del paciente, y la enfermedad o trastorno a tratar. Las personas del oficio de nivel medio conocen la importancia de estos y otros factores que deben considerarse. Por lo general, la cantidad de la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administrará en un rango de alrededor de 1 miligramo por metro cuadrado del área de superficie del cuerpo del paciente (mg/m²) a 1,000/m², con un rango de dosis de alrededor de 10 mg/m² a alrededor de 100 mg/m² para tratar enfermedades, incluidas, entre otras, ALL o LBL. Por supuesto, se pueden emplear otras dosis y/o regímenes de tratamiento, según lo determine el médico a cargo.

[0091] En algunas formas de realización, el método comprende administrar la L-asparaginasa recombinante de la presente divulgación en una cantidad de alrededor de 10 mg/m² a alrededor de 100 mg/m². En algunas formas de realización, el método comprende administrar la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación en una cantidad de 10 mg/m² a de 100 mg/m². En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de alrededor de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 95 o 95 mg/m² o una cantidad equivalente de estos (por ejemplo, en función del

contenido de proteínas). En una forma de realización más específica, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad seleccionada del grupo que consiste en alrededor de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y alrededor de 100 mg/m². En otra forma de realización específica, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra a una dosis mayor de o igual a alrededor de 1, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 95, 100, 200 o 300 mg/m². En otra forma de realización específica, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra a una dosis menor de o igual a alrededor de 300, 200, 100, 95, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, o 1 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 12 mg/m² y alrededor de 90 mg/m². En otra forma de realización de ejemplo, la L-asparaginasa recombinante de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 20 mg/m² y alrededor de 80 mg/m². En otra forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 25 mg/m² y alrededor de 70 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 25 mg/m² y alrededor de 80 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 37,5 mg/m² y alrededor de 80 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 37,5 mg/m² y alrededor de 65 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la L-asparaginasa recombinante de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 25 mg/m² y alrededor de 37,5 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 25 mg/m² y alrededor de 100 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 25 mg/m² y alrededor de 65 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 25 mg/m² y alrededor de 80 mg/m².

[0092] En algunas formas de realización, el método comprende administrar la L-asparaginasa recombinante de la presente divulgación en una cantidad de alrededor

de 25 mg/m² a alrededor de 50 mg/m². En algunas formas de realización, el método comprende administrar la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación en una cantidad de 25 mg/m² y de 50 mg/m². En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de alrededor de 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 mg/m² o una cantidad equivalente de esta (por ejemplo, en función del contenido de proteínas).

[0093] En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 20 mg/m² y alrededor de 30 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 22,5 mg/m² y alrededor de 28,5 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 23 mg/m² y alrededor de 27 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la L-asparaginasa recombinante de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 24 mg/m² y alrededor de 26 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 24,5 mg/m² y alrededor de 25,5 mg/m².

[0094] En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 40 mg/m² y alrededor de 60 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 42,5 mg/m² y alrededor de 58,5 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 43 mg/m² y alrededor de 57 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la L-asparaginasa recombinante de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 44 mg/m² y alrededor de 56 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 45 mg/m² y alrededor de 55 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 46 mg/m² y alrededor de 54 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 47,5 mg/m² y alrededor de 52,5 mg/m². En una

forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 48 mg/m² y alrededor de 52 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la L-asparaginasa recombinante de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 49 mg/m² y alrededor de 51 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 49,5 mg/m² y alrededor de 50,5 mg/m².

[0095] En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 30 mg/m² y alrededor de 75 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 35 mg/m² y alrededor de 70 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 40 mg/m² y alrededor de 65 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la L-asparaginasa recombinante de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 45 mg/m² y alrededor de 60 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 50 mg/m² y alrededor de 55 mg/m².

[0096] En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 40 mg/m² y alrededor de 75 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 45 mg/m² y alrededor de 70 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 50 mg/m² y alrededor de 65 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la L-asparaginasa recombinante de la presente divulgación se administra en una cantidad entre alrededor de 55 mg/m² y alrededor de 60 mg/m².

[0097] En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 40 mg/m² y alrededor de 60 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 45 mg/m² y alrededor de 55 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 47,5 mg/m² y alrededor de 50 mg/m².

[0098] En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 30 mg/m² y alrededor de 35 mg/m².

[0099] En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 30 mg/m² y alrededor de 95 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 35 mg/m² y alrededor de 90 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 40 mg/m² y alrededor de 85 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 45 mg/m² y alrededor de 80 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 50 mg/m² y alrededor de 75 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 55 mg/m² y alrededor de 70 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 60 mg/m² y alrededor de 65 mg/m².

[0100] En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 30 mg/m² y alrededor de 60 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 35 mg/m² y alrededor de 55 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 40 mg/m² y alrededor de 50 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 42,5 mg/m² y alrededor de 57,5 mg/m².

[0101] En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 30 mg/m² y alrededor de 75 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 35 mg/m² y alrededor de 70 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en

una cantidad de entre alrededor de 40 mg/m² y alrededor de 65 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 45 mg/m² y alrededor de 60 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra en una cantidad de entre alrededor de 50 mg/m² y alrededor de 55 mg/m².

[0102] En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra intramuscularmente en una cantidad de entre alrededor de 10 mg/m² y alrededor de 50 mg/m². En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra intramuscularmente en una cantidad de entre alrededor de 12,5 mg/m² y alrededor de 47,5 mg/m². En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra intramuscularmente en una cantidad de entre alrededor de 15 mg/m² y alrededor de 45 mg/m². En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra intramuscularmente en una cantidad de entre alrededor de 20 mg/m² y alrededor de 42,5 mg/m². En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra intramuscularmente en una cantidad de entre alrededor de 22,5 mg/m² y alrededor de 40 mg/m². En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra intramuscularmente en una cantidad de entre alrededor de 24 mg/m² y alrededor de 39 mg/m². En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra intramuscularmente en una cantidad de entre alrededor de 27 mg/m² y alrededor de 37,5 mg/m². En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra intramuscularmente en una cantidad de entre alrededor de 30 mg/m² y alrededor de 45 mg/m². En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra intramuscularmente en una cantidad de alrededor de 25 mg/m². En algunas formas de realización, la L-asparaginasa recombinante de la presente divulgación se administra intramuscularmente en una cantidad de 25 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra intramuscularmente en una cantidad de entre alrededor de 25 mg/m² y alrededor de 80 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra intramuscularmente en una cantidad de entre alrededor de 37,5 mg/m² y alrededor de

50 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra intramuscularmente en una cantidad de entre alrededor de 30 mg/m² y alrededor de 35 mg/m².

[0103] En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de entre alrededor de 10 mg/m² y alrededor de 95 mg/m². En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de entre alrededor de 20 mg/m² y alrededor de 60 mg/m². En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de entre alrededor de 22,5 mg/m² y alrededor de 57,5 mg/m². En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de entre alrededor de 25 mg/m² y alrededor de 55 mg/m². En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de entre alrededor de 27,5 mg/m² y alrededor de 47,5 mg/m². En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de entre alrededor de 30 mg/m² y alrededor de 45 mg/m². En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de entre alrededor de 32,5 mg/m² y alrededor de 42,5 mg/m². En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de entre alrededor de 21,5 mg/m² y alrededor de 38,5 mg/m². En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de entre alrededor de 36 mg/m² y alrededor de 45 mg/m². En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de alrededor de 37,5 mg/m². En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de 37,5 mg/m². En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de 50 mg/m².

[0104] En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de entre alrededor de 25 mg/m² y alrededor de 37,5 mg/m². En una forma de realización de

[illegible]

ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de entre alrededor de 42,5 mg/m² y alrededor de 57,5 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de entre alrededor de 30 mg/m² y alrededor de 75 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de entre alrededor de 35 mg/m² y alrededor de 70 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de entre alrededor de 40 mg/m² y alrededor de 65 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de entre alrededor de 45 mg/m² y alrededor de 60 mg/m². En una forma de realización de ejemplo, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de entre alrededor de 50 mg/m² y alrededor de 55 mg/m².

[0105] En otra forma de realización, el método comprende la administración de una L-asparaginasa de la presente divulgación que provoca una respuesta inmunogénica baja en un paciente en comparación a una L-asparaginasa no recombinante.

2. Frecuencia de dosis

[0106] En una forma de realización específica, el tratamiento se administra en una dosis de alrededor de 1 mg/m² a alrededor de 1000 mg/m², normalmente de alrededor de 10 mg/m² a alrededor de 100 mg/m², en un horario de alrededor de tres veces a la semana a alrededor de una vez al mes, normalmente una vez a la semana o una vez cada dos semanas, como agente único (por ejemplo, monoterapia) o como parte de una combinación de fármacos quimioterápicos, incluidos, entre otros, glucocorticoides, corticosteroides, compuestos anticancerígenos u otros agentes, incluidos, entre otros, metotrexato, dexametasona, prednisona, prednisolona, vincristina, ciclofosfamida y antraciclina.

[0107] La formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se puede administrar antes, después o simultáneamente con otros compuestos como parte de un régimen de quimioterapia con múltiples agentes. En una forma de realización particular, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación comprende una proteína producida de forma recombinante en *Pseudomonas fluorescens* y, más específicamente, la formulación de L-asparaginasa comprende una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO:1. En algunas formas de realización, la formulación de L-

asparaginasa de la presente divulgación se administra en una dosis que reduce la L-asparaginasa a niveles indetectables al usar métodos y aparatos conocidos en el estado de la técnica por un periodo de alrededor de tres días a alrededor de diez días (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 días) para una dosis sola.

[0108] En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra tres veces por semana. En una algunas formas de realización, se administra la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación cada dos días durante un período de 5 días consecutivos seguido de un período de descanso de 2 días consecutivos. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra los días lunes, miércoles y viernes de la misma semana. **[0247]** En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra tres veces por semana de una, como mínimo, a tres semanas. En una algunas formas de realización, se administra la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación cada dos días durante un período de 5 días consecutivos seguido de un período de descanso de 2 días consecutivos durante alrededor de una a tres semanas. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra los días lunes, miércoles y viernes de la semana durante alrededor de una semana a tres semanas.

[0109] En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra tres veces por semana durante alrededor de dos semanas. En una algunas formas de realización, se administra la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación cada dos días durante un período de 5 días consecutivos seguido de un período de descanso de 2 días consecutivos durante alrededor de dos semanas. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra los días lunes, miércoles y viernes de la misma semana durante alrededor de dos semanas.

[0110] En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra tres veces por semana durante dos semanas. En una algunas formas de realización, se administra la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación cada dos días durante un período de 5 días consecutivos seguido de un período de descanso de 2 días consecutivos durante dos semanas. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra los días lunes, miércoles y viernes de la misma semana durante dos semanas.

[0111] En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra tres veces por semana, continuando hasta que el paciente deje de tener una enfermedad tratable mediante la reducción de asparagina. En una algunas formas de realización, se administra la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación cada dos días durante un período de 5 días consecutivos seguido de un período de descanso de 2 días consecutivos, continuando hasta que el paciente deje de tener una enfermedad tratable mediante la reducción de asparagina. En algunas formas de realización, la L-asparaginasa recombinante de la presente divulgación se administra los días lunes, miércoles y viernes de la misma semana, continuando hasta que el paciente deje de tener una enfermedad tratable mediante la reducción de asparagina.

[0112] En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra tres veces por semana, continuando hasta que el paciente decida finalizar o posponer el tratamiento. En una algunas formas de realización, se administra la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación cada dos días durante un período de 5 días consecutivos seguido de un período de descanso de 2 días consecutivos, continuando hasta que el paciente decida finalizar o posponer el tratamiento. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra los días lunes, miércoles y viernes de la misma semana, continuando hasta que el paciente decida finalizar o posponer el tratamiento.

[0113] En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra alrededor de cada 48 horas. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra cada 40 a 58 horas. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra alrededor de cada 42 a 56 horas. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra alrededor de cada 44 a 52 horas. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra alrededor de cada 46 a 50 horas. En algunas formas de realización, la L-asparaginasa recombinante de la presente divulgación se administra alrededor de cada 72 horas. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra cada 64 a 80 horas. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra alrededor de cada 66 a 78 horas. En algunas formas de realización, la formulación de

L-asparaginasa de la presente divulgación se administra alrededor de cada 68 a 76 horas. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra alrededor de cada 70 a 74 horas.

[0114] En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra como una segunda línea de tratamiento con pacientes que son hipersensibles a una L-asparaginasa derivada de *E. coli*, y/o pueden haber tenido una hipersensibilidad previa a una L-asparaginasa derivada de *Erwinia chrysanthemi*.

[0115] En algunas formas de realización, la formulación L-asparaginasa se administra al sujeto humano como un sustituto para una dosis de una asparaginasa de acción prolongada derivada de *E. coli*. En algunas formas de realización, se administran seis dosis de la formulación L-asparaginasa al sujeto humano como un sustituto para una dosis de la asparaginasa de acción prolongada derivada de *E. coli*. En algunas formas de realización, se administran siete dosis de la formulación L-asparaginasa al sujeto humano como un sustituto para una dosis de la asparaginasa de acción prolongada derivada de *E. coli*. En algunas formas de realización, la asparaginasa de acción prolongada derivada de *E. coli* es la pegaspargasa. En una forma de realización adicional, las seis dosis separadas pueden administrarse en un periodo de alrededor de dos semanas. En otra forma de realización adicional, las siete dosis separadas pueden administrarse en un periodo de alrededor de dos semanas.

[0116] En algunas formas de realización, un régimen de dosis para la formulación de L-asparaginasa comprende un ciclo, en donde el ciclo comprende una primera dosis, una segunda dosis y una tercera dosis, en donde el ciclo es opcionalmente repetible, y en donde la primera dosis, la segunda dosis y la tercera dosis se administran con un intervalo de 48-72 horas.

[0117] En algunas formas de realización, las cantidades de las dosis pueden variar dentro del ciclo.

[0118] En algunas formas de realización, un régimen de dosis para la formulación de L-asparaginasa comprende un ciclo, en donde el ciclo es opcionalmente repetible, y en donde el ciclo comprende la administración de la formulación de L-asparaginasa en días alternos durante un periodo de cinco días consecutivos seguido de un periodo de descanso de dos días consecutivos, en donde la primera dosis del ciclo es de 25 mg/m², la segunda dosis del ciclo es de 25 mg/m² y la tercera dosis del ciclo es de 50 mg/m², seguidas del periodo de descanso de dos días consecutivos.

[0119] En algunas formas de realización, un régimen de dosis para la formulación de

L-asparaginasa comprende un ciclo, en donde el ciclo es opcionalmente repetible, y en donde el ciclo comprende la administración de la formulación de L-asparaginasa en días alternos durante un periodo de cinco días consecutivos seguido de un periodo de descanso de dos días consecutivos, en donde la primera dosis del ciclo es de 25 mg/m², la segunda dosis del ciclo es de 25 mg/m² y la tercera dosis del ciclo es de 37,5 mg/m², seguidas del periodo de descanso de dos días consecutivos.

[0120] En algunas formas de realización, un régimen de dosis para la formulación de L-asparaginasa comprende un ciclo, en donde el ciclo es opcionalmente repetible, y en donde el ciclo comprende la administración de la formulación de L-asparaginasa en días alternos durante un periodo de cinco días consecutivos seguido de un periodo de descanso de dos días consecutivos, en donde la primera dosis del ciclo es de 37,5 mg/m², la segunda dosis del ciclo es de 37,5 mg/m² y la tercera dosis del ciclo es de 37,5 mg/m², seguidas del periodo de descanso de dos días consecutivos.

[0121] En algunas formas de realización, un régimen de dosis para la formulación de L-asparaginasa comprende un ciclo, en donde el ciclo es opcionalmente repetible, y en donde el ciclo comprende la administración de la formulación de L-asparaginasa en días alternos durante un periodo de cinco días consecutivos seguido de un periodo de descanso de dos días consecutivos, en donde la primera dosis del ciclo es de 37,5 mg/m², la segunda dosis del ciclo es de 25 mg/m² y la tercera dosis del ciclo es de 37,5 mg/m², seguidas del periodo de descanso de dos días consecutivos.

[0122] En algunas formas de realización, un régimen de dosis para la formulación de L-asparaginasa comprende un ciclo, en donde el ciclo es opcionalmente repetible, y en donde el ciclo comprende la administración de la formulación de L-asparaginasa en días alternos durante un periodo de cinco días consecutivos seguido de un periodo de descanso de dos días consecutivos, en donde la primera dosis del ciclo es de 37,5 mg/m², la segunda dosis del ciclo es de 25 mg/m² y la tercera dosis del ciclo es de 25 mg/m², seguidas del periodo de descanso de dos días consecutivos. En algunas formas de realización, se administra la primera dosis del ciclo un lunes, se administra la segunda dosis un miércoles y se administra la tercera dosis un viernes.

[0123] En algunas formas de realización, un régimen de dosis para la formulación de L-asparaginasa comprende un ciclo, en donde el ciclo es opcionalmente repetible, y en donde el ciclo comprende la administración de la formulación de L-asparaginasa en días alternos durante un periodo de cinco días consecutivos seguido de un periodo de descanso de dos días consecutivos, en donde la primera dosis del ciclo es de 25 mg/m², la segunda dosis del ciclo es de 25 mg/m² y la tercera dosis del ciclo es de 50

mg/m², seguidas del periodo de descanso de dos días consecutivos. En algunas formas de realización, se administra la primera dosis del ciclo un lunes, se administra la segunda dosis un miércoles y se administra la tercera dosis un viernes.

[0124] En algunas formas de realización, la presente divulgación proporciona un método para reducir la asparaginasa en un sujeto humano para tratar la leucemia linfoblástica aguda (ALL) o linfoma linfoblástico (LBL), en donde dicho método comprende: en los días, lunes, miércoles y viernes, administrar alrededor de 25 mg/m² de L-asparaginasa intramuscularmente a un sujeto humano, de tal forma que el sujeto humano reciba un total de siete dosis de L-asparaginasa durante un periodo de dos semanas.

[0125] En algunas formas de realización, la presente divulgación proporciona un método para reducir la asparaginasa en un sujeto humano para tratar la leucemia linfoblástica aguda (ALL) o linfoma linfoblástico (LBL), en donde dicho método comprende: a) en los días lunes y miércoles administrar alrededor de 25 mg/m² de L-asparaginasa intramuscularmente a un sujeto humano, y b) en los días viernes, administrar alrededor de 50 mg/m² de L-asparaginasa intramuscularmente a un sujeto humano; de tal forma que el sujeto humano reciba un total de seis dosis de L-asparaginasa durante un periodo de dos semanas.

[0126] El régimen de dosis puede abarcar cualquier cantidad de ciclos durante cualquier cantidad de semanas o hasta cualquier criterio de valorización establecido en la presente.

[0127] En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de (i) 25 mg/m² los lunes, (ii) 25 mg/m² los miércoles y (iii) 50 mg/m² los viernes.

[0128] En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de 25 mg/m² cada 48 horas. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de 37,5 mg/m² cada 48 horas. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra por vía intravenosa en una cantidad de 50 mg/m² cada 48 horas.

[0129] En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra intramuscularmente en una cantidad de 25 mg/m² cada 48 horas. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra intramuscularmente en una cantidad de 37,5

mg/m² cada 48 horas. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra intramuscularmente en una cantidad de 50 mg/m² cada 48 horas.

[0130] En algunas formas de realización, en conjunto con otras formas de realización anteriores o posteriores, la formulación de L-asparaginasa de la presente divulgación se administra (i) por vía intravenosa en una cantidad de 25 mg/m² los lunes, (ii) por vía intravenosa una cantidad de 25 mg/m² los miércoles y (iii) por vía intramuscular una cantidad de 50 mg/m² los viernes.

[0131] Por ejemplo, un régimen de dosis puede comprender la administración de seis dosis (por ejemplo, una primera dosis, una segunda dosis, una tercera dosis, una cuarta dosis, una quinta dosis y una sexta dosis) de la formulación de L-asparaginasa durante un periodo de dos semanas, en donde durante la primera semana, (i) se administra una primera dosis por vía intravenosa o intramuscular en una cantidad de 25 mg/m² o 37,5 mg/m² el lunes, (ii) se administra una segunda dosis por vía intravenosa o intramuscular en una cantidad de 25 mg/m² 37. 5 mg/m² el miércoles, y (iii) una tercera dosis se administra por vía intravenosa o intramuscular en una cantidad de 25 mg/m² 37,5 mg/m² el viernes; y durante la segunda semana, (iv) una cuarta dosis se administra por vía intravenosa en una cantidad de 25 mg/m² el lunes, (v) una quinta dosis se administra por vía intravenosa en una cantidad de 25 mg/m² el miércoles, y (vi) una sexta dosis se administra por vía intramuscular en una cantidad de 50 mg/m² el viernes.

[0132] En algunas formas de realización, un régimen de dosis comprende la administración de seis dosis de la formulación de L-asparaginasa durante un período de dos semanas, en donde durante la primera semana, (i) una primera dosis se administra por vía intravenosa en una cantidad de 25 mg/m² el lunes, (ii) una segunda dosis se administra por vía intravenosa en una cantidad de 25 mg/m² el miércoles, y (iii) una tercera dosis se administra por vía intravenosa en una cantidad de 25 mg/m² el viernes; y durante la segunda semana, (iv) una cuarta dosis se administra por vía intravenosa en una cantidad de 25 mg/m² el lunes, (v) una quinta dosis se administra por vía intravenosa en una cantidad de 25 mg/m² el miércoles, y (vi) una sexta dosis se administra por vía intramuscular en una cantidad de 50 mg/m² el viernes.

[0133] En algunas formas de realización, un régimen de dosis comprende la administración de seis dosis de la formulación de L-asparaginasa durante un período de dos semanas, en donde durante la primera semana, (i) una primera dosis se administra por vía intramuscular en una cantidad de 25 mg/m² el lunes, (ii) una

segunda dosis se administra por vía intramuscular en una cantidad de 25 mg/m² el miércoles, y (iii) una tercera dosis se administra por vía intramuscular en una cantidad de 25 mg/m² el viernes; y durante la segunda semana, (iv) una cuarta dosis se administra por vía intravenosa en una cantidad de 25 mg/m² el lunes, (v) una quinta dosis se administra por vía intravenosa en una cantidad de 25 mg/m² el miércoles, y (vi) una sexta dosis se administra por vía intramuscular en una cantidad de 50 mg/m² el viernes.

[0134] En algunas formas de realización, un régimen de dosis comprende la administración de seis dosis de la formulación de L-asparaginasa durante un período de dos semanas, en donde durante la primera semana, (i) una primera dosis se administra por vía intravenosa en una cantidad de 37,5 mg/m² el lunes, (ii) una segunda dosis se administra por vía intravenosa en una cantidad de 37,5 mg/m² el miércoles, y (iii) una tercera dosis se administra por vía intravenosa en una cantidad de 37,5 mg/m² el viernes; y durante la segunda semana, (iv) una cuarta dosis se administra por vía intravenosa en una cantidad de 25 mg/m² el lunes, (v) una quinta dosis se administra por vía intravenosa en una cantidad de 25 mg/m² el miércoles, y (vi) una sexta dosis se administra por vía intramuscular en una cantidad de 50 mg/m² el viernes.

[0135] En algunas formas de realización, un régimen de dosis comprende la administración de seis dosis de la formulación de L-asparaginasa durante un período de dos semanas, en donde durante la primera semana, (i) una primera dosis se administra por vía intramuscular en una cantidad de 37,5 mg/m² el lunes, (ii) una segunda dosis se administra por vía intramuscular en una cantidad de 37,5 mg/m² el miércoles, y (iii) una tercera dosis se administra por vía intramuscular en una cantidad de 37,5 mg/m² el viernes; y durante la segunda semana, (iv) una cuarta dosis se administra por vía intravenosa en una cantidad de 25 mg/m² el lunes, (v) una quinta dosis se administra por vía intravenosa en una cantidad de 25 mg/m² el miércoles, y (vi) una sexta dosis se administra por vía intramuscular en una cantidad de 50 mg/m² el viernes.

[0136] En algunas formas de realización, un régimen de dosis comprende la administración de seis dosis de la formulación de L-asparaginasa durante un período de dos semanas, en donde durante la primera semana, (i) una primera dosis se administra por vía intravenosa en una cantidad de 25 mg/m² el lunes, (ii) una segunda dosis se administra por vía intravenosa en una cantidad de 25 mg/m² el miércoles, y (iii) una tercera dosis se administra por vía intravenosa en una cantidad de 50 mg/m² el

viernes; y durante la segunda semana, (iv) una cuarta dosis se administra por vía intravenosa en una cantidad de 25 mg/m² el lunes, (v) una quinta dosis se administra por vía intravenosa en una cantidad de 25 mg/m² el miércoles, y (vi) una sexta dosis se administra por vía intramuscular en una cantidad de 50 mg/m² el viernes.

Kits

[0137] En un aspecto, se proporciona en la presente un kit, que comprende: (i) cualquiera de las formulaciones descritas en la presente; y (ii) instrucciones para tratar una enfermedad, afección o trastorno que se puede tratar mediante la disminución de asparagina en un sujeto que lo necesite.

[0138] En algunos aspectos, el kit comprende una formulación que comprende: (i) una L-asparaginasa, en donde la L-asparaginasa comprende cuatro unidades monoméricas, en donde cada unidad monomérica tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 70 % idéntica a SEQ ID NO: 1; y (ii) uno o más estabilizantes, o uno o más amortiguadores o cualquier combinación de estos. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa comprende menos de alrededor de 0,6 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 40 °C durante dos meses. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa comprende menos de 2 % de especies de alto peso molecular (HMW) después del almacenamiento a 40 °C durante dos meses. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa comprende menos de alrededor de 0,6 % de especies de bajo peso molecular (LMW) y menos del 2 % de especies de alto peso molecular (HMW) después del almacenamiento a 40 °C durante dos meses. En algunas formas de realización, la formulación de L-asparaginasa comprende menos de alrededor de 0,6 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana.

[0139] En algunas formas de realización, el kit comprende una formulación, que comprende: (i) una L-asparaginasa, en donde la L-asparaginasa comprende cuatro unidades monoméricas, en donde cada unidad monomérica tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 % idéntica a SEQ ID NO: 1; (ii) uno o más disacáridos, en donde el uno o más disacáridos comprenden trehalosa, sacarosa o cualquier combinación de estas; y (iii) uno o más amortiguadores, en donde el uno o más amortiguadores están sustancialmente libres de aminoácidos, en donde la formulación comprende menos de alrededor de 5 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana.

[0140] En algunas formas de realización, el kit comprende una formulación que

comprende (i) una L-asparaginasa que comprende cuatro unidades monoméricas, en donde cada unidad monomérica tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de un 70 % idéntica a SEQ ID NO: 1; y en donde la L-asparaginasa está presente en una concentración de alrededor de 20 mg/ml; (ii) trehalosa, en donde la trehalosa está presente en una concentración de alrededor de 170 mM; (iii) fosfato de sodio, en donde el fosfato de sodio está presente en una concentración de alrededor de 20 mM; (iv) cloruro de sodio, en donde el cloruro de sodio está presente en una concentración de alrededor de 50 mM; y (v) polisorbato 80, en donde el polisorbato 80 está presente en una concentración de alrededor de 0,02 % (p/v), en donde la formulación comprende menos de alrededor del 0,6 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana. En algunas formas de realización, la formulación tiene un pH de entre alrededor de 4,0 y alrededor de 8,5. En algunas formas de realización, la formulación tiene un pH de alrededor de 7,0.

[0141] En algunas formas de realización, el kit comprende una formulación que comprende (i) una L-asparaginasa, en donde la L-asparaginasa comprende cuatro unidades monoméricas, en donde cada unidad monomérica tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 % idéntica a SEQ ID NO: 1; y en donde la L-asparaginasa está presente en una concentración de alrededor de 20 mg/ml; (ii) trehalosa, en donde la trehalosa está presente en una concentración de alrededor de 170 mM; (iii) fosfato de sodio, en donde el fosfato de sodio está presente en una concentración de alrededor de 20 mM; (iv) cloruro de sodio, en donde el cloruro de sodio está presente en una concentración de alrededor de 50 mM; y (v) polisorbato 80, en donde el polisorbato 80 está presente en una concentración de alrededor de 0,02 % (p/v), en donde la formulación comprende menos de alrededor del 5 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana. En algunas formas de realización, la formulación tiene un pH de entre alrededor de 4,0 y alrededor de 8,5. En algunas formas de realización, la formulación tiene un pH de alrededor de 7,0.

[0142] En algunas formas de realización de las anteriores, los kits comprenden instrucciones para tratar el cáncer. En algunas formas de realización, los kits comprenden instrucciones para tratar la leucemia linfoblástica aguda (ALL). En algunas formas de realización, la ALL tiene recaídas. En algunas formas de realización, los kits comprenden instrucciones para tratar el linfoma linfoblástico (LBL). En algunas formas de realización, el LBL tiene recaídas.

EJEMPLOS

Actividad de nessler

[0143] Se midió la actividad de la asparaginasa mediante un ensayo de Nessler, en donde la medición de la actividad de la asparaginasa se basa en un ensayo de límite de criterio de valorización en donde la enzima se incubó a +37 °C bajo concentración saturante de L-asparaginasa durante 15 minutos. La reacción se detiene mediante la adición del reactivo de Nessler y la cantidad de amoníaco producida durante la reacción se evalúa colorimétricamente (a 450 nm) al utilizar una curva de calibración construida a partir de cantidades conocidas de sulfato de amonio.

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

[0144] La columna se acondicionó con fase móvil (50 mM fosfato, 200 mM NaCl, pH 7,0) a 1 ml/min durante 1 hora antes de las inyecciones. Los estándares de filtración en gel de BioRad se diluyeron 10 veces en dextrano azul para un volumen total de 1 ml. Las muestras y los patrones de referencia se diluyeron a 1 mg/ml en fase móvil y se inyectaron después de múltiples inyecciones de blancos de fase móvil para limpiar la columna.

[0145] Nótese que, en diferentes tablas de los ejemplos a continuación, la entrada «ND» indica que un punto de información particular no se ha determinado.

Ejemplo 1: Amortiguador de nivel inicial/Filtro de excipiente

[0146] Se evaluaron los efectos del pH y del tipo de amortiguador de seis combinaciones de amortiguador y pH en el intervalo de 4,5 - 8,0 sobre la estabilidad de la L-asparaginasa. Se preparó un conjunto adicional de formulaciones con 6 excipientes diferentes en amortiguador de histidina 20 mM a pH 7,0 o fosfato de sodio 20 mM a pH 8,0 como un cribado inicial de excipientes (**Tabla 1**). La L-asparaginasa (1,0 ml del lote RM-LAP-P03/P05/P06 a 20,9 mg/ml) se intercambió en amortiguador mediante el uso de dispositivos de ultrafiltración centrífuga (Amicon Ultra-4 10k MWCO) con 100 ml del amortiguador de formulación correspondiente. Tras el intercambio final de amortiguador, se midió la concentración de proteínas y las muestras se ajustaron a alrededor de 20 mg/ml. Las muestras formuladas se dividieron en dos alícuotas y se realizó un estudio de estabilidad de una semana con los RC formulados a 37 °C y 5 °C. Las formulaciones se analizaron en paralelo al final de la semana de almacenamiento.

Tabla 1

Amortiguador	pH	Excipiente	pH medido	Concentración medida (mg/ml)
Acetato	4,5		4,6	22

(20mM)	5,5	N/A	5,6	22
Succinato (20mM)	4,5		4,6	18
	5,5		5,6	19
	6,5		6,5	20
Citrato de sodio (20mM)	5,0		5,1	22
	6,0		6,0	22
	7,0		6,9	20
Histidina (20mM)	6,0		6,0	21
	7,0		7,1	20
Fosfato (20mM)	6,5		6,6	21
	7,5		7,4	19
	8,0		7,9	18
Tris (20mM)	8,5		8,5	19
20mM Histidina	7,0	3 % (p/v) propolina	7,1	22
		150mM arginina	6,9	21
		250mM trehalosa	6,9	18
		250mM sorbitol	7,1	19
		250mM sacarosa	7,1	22
20mM Fosfato	8,0	150mM lisina	6,96	21
		150mM NaCl	7,97	22
		150 arginina	7,89	22
		250mM trehalosa	7,88	18
		250mM sorbitol	7,90	18
		250mM sacarosa	7,87	22
			7,85	19

[0147] El objetivo del cribado de excipientes era evaluar amortiguadores de acetato, succinato, citrato, histidina, fosfato y tris de pH 4,5 a 8,5. Además, se evaluó la influencia de los excipientes prolina, lisina, cloruro de sodio, arginina, trehalosa, sorbitol y sacarosa en amortiguador de histidina a pH 7,0 o amortiguador de fosfato a pH 8,0. Se emplea SEC y la actividad de Nessler para evaluar la estabilidad de RC en presencia de estos excipientes en los amortiguadores seleccionados.

[0148] La pureza de 26 formulaciones fue evaluada por SEC-HPLC. Los resultados se resumen en la **Tabla 2** y la **Tabla 3**. Se observó poca diferencia en los perfiles SEC entre las temperaturas 5 °C a 37 °C después de una semana de almacenamiento para todas las formulaciones. Sin embargo, se observaron diferencias entre diferentes formulaciones. Los picos de pureza principales fueron de 66,4 – 98,3 %. Todas las formulaciones de amortiguador de histidina tenían niveles de pureza entre el 66,4 % y el 74,0 %, mientras que las restantes tenían niveles de pureza entre el 90,6 % y el 98,3 %. En los amortiguadores de histidina, succinato, citrato, fosfato con lisina y fosfato con arginina, se observó una especie LMW a los ~11,6 minutos que oscilaba

entre el 1,3 y el 32,4 %. Las formulaciones en amortiguadores de acetato, fosfato y tris mostraron entre un 0,2 y un 0,6 % de especies LMW. Las formulaciones en amortiguador de fosfato con cloruro de sodio, trehalosa, sorbitol y sacarosa mostraron niveles similares de especies LMW a las formulaciones sin excipientes.

Tabla 2

Amortiguador	pH	Temperatura (°C)	Porcentaje HMW promedio (%)	Porcentaje de pico principal promedio (%)	Porcentaje LMW promedio (%)
Acetato 20mM	4.5	5	1.8	97.7	0.5
		37	1.5	97.9	0.6
	5.5	5	1.7	97.7	0.6
		37	1.7	97.8	0.5
Succinato 20Mm	4.5	5	1.7	96.8	1.5
		37	1.5	96.9	1.6
	5.5	5	1.8	96.8	1.3
		37	1.6	96.0	2.4
	6.5	5	1.8	96.8	1.4
		37	1.7	96.3	2.0
Citrato de sodio 20mM	5.0	5	1.8	95.3	2.8
		37	1.6	95.5	2.9
	6.0	5	1.8	95.2	3.1
		37	1.6	95.2	3.2
	7.0	5	1.8	95.7	2.5
		37	1.7	95.7	2.6
Histidina 20mM	6.0	5	1.3	71.7	27.0
		37	1.1	72.7	26.1
	7.0	5	1.3	70.7	28.0
		37	1.0	72.2	26.8
Fosfato 20mM	6.5	5	1.8	97.9	0.3
		37	1.6	98.1	0.2
	7.5	5	1.8	97.8	0.4
		37	1.6	98.2	0.2
	8.0	5	1.8	97.8	0.3
		37	1.5	98.2	0.3
Tris 20mM	8.5	5	1.8	97.9	0.3
		37	1.5	98.3	0.2

Tabla 3

Amortiguador	Excipiente	Temperatura °C	Porcentaje HMW promedio (%)	Porcentaje de picos principales promedios (%)	Porcentaje LMW promedio (%)
Histidina 20mM, pH 7.0	Propolina 3% (p/v)	5	1.2	67.9	30.9
		37	1.0	68.4	30.5
	NaCl 150mM	5	1.4	69.0	29.6
		37	1.1	69.7	29.2
	Arginina 150mM	5	1.3	66.4	32.4
		37	1.1	66.9	32.0
	Trehalosa 250mM	5	1.2	68.2	30.7
		37	1.0	68.7	30.3
	Sorbitol 250mM	5	1.3	71.1	27.6
		37	1.0	74.0	25.0
	Sacarosa 250mM	5	1.2	71.4	27.4
		37	1.1	71.8	27.2
Fosfato 20mM, pH 8.0	Lisina 150mM	5	1.7	95.9	2.4
		37	1.4	96.4	2.2
	NaCl 150mM	5	1.9	97.8	0.3
		37	1.5	98.3	0.2
	Arginina 150mM	5	1.7	90.6	7.7
		37	1.3	91.2	7.5
	Trehalosa 250mM	5	1.8	97.9	0.3
		37	1.8	98.0	0.2
	Sorbitol 250mM	5	1.9	97.8	0.3
		37	1.7	98.1	0.2
	Sacarosa 250mM	5	1.8	97.9	0.3
		37	1.6	98.1	0.3

[0149] En función de la mayor pureza y el menor porcentaje de especies LMW, se seleccionaron el acetato y el amortiguador de fosfato para su posterior evaluación. Además, se eligieron la trehalosa, el sorbitol y el cloruro de sodio como excipientes a evaluar en la EOD para valorar su impacto en la estabilidad de la formulación en condiciones de estrés más estrictas.

Ejemplo 2: DOE

[0150] Se utilizó un enfoque de diseño estadístico de experimentos (DOE) considerando un factor numérico (pH) y un factor categórico (excipiente) para evaluar los efectos del pH y el excipiente para el amortiguador de fosfato y acetato en el rango de 4,5 - 5,5 y 7,0 - 8,0, respectivamente, sobre la L-asparaginasa. Para tener en cuenta los rangos no superpuestos de los dos sistemas de amortiguador, acetato y fosfato, se realizaron dos DOE independientes mediante el uso de un diseño lineal de un factor para cada sistema de amortiguador en paralelo. El diseño experimental se generó al usar Stat Ease, Inc. Design-Expert® Version 9.0.6.2. La significación de las respuestas se evaluó con un nivel de confianza del 95 %.

[0151] Un conjunto adicional de formulaciones fuera de diseño evaluó el efecto de los tres excipientes seleccionados utilizando amortiguador de Tris a pH 8,5 y el efecto de la adición de PS-80 a DOEs de acetato a pH 5,3 y fosfato a pH 7,5 con sorbitol y trehalosa. Las formulaciones fueron expuestas a un estrés térmico, 40 °C durante dos semanas y un ciclo de congelación/descongelación único.

[0152] El ensayo de actividad de Nessler para formulaciones expuestas a un solo ciclo de congelación/descongelación o almacenadas durante 2 semanas a 40 °C tuvo actividades que oscilaron entre 600 y 1270 $\mu\text{mol}/\text{min.mgE}$ (**Tabla 4** y **Tabla 5**). No se observó ninguna pérdida significativa de actividad de las formulaciones debido al estrés térmico o de congelación/descongelación, y no está determinado si las formulaciones con mayor actividad son resultado del amortiguador de la formulación o de la variabilidad del ensayo de actividad de Nessler. Las formulaciones fueron analizadas por RP-HPLC. Mediante RP-HPLC, se determinó que todas las formulaciones, tanto en amortiguador de acetato como en amortiguador de fosfato, presentaban un pico principal del 100 % tras un único estrés de congelación/descongelación, y un pico principal de 98 % y un pico menor de 2 % tras 2 semanas a 40 °C.

Tabla 4

Amortiguador	pH	Excipiente	Actividad enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min.mgE}$) congelación/descongelación	Actividad enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min.mgE}$) 40°C 75% RH
Fosfato 20mM	7.00	Sorbitol 250mM	726	831
			639	600
			773	1270
	7.50	Sorbitol 250mM	718	748
			784	883
	8.00	Sorbitol 250mM	675	862
			759	1104
			744	723
	7.00	Trehalosa 250mM	800	800
			747	1149
			788	990
	7.50	Trehalosa 250mM	853	880
			873	985
			740	878
	8.00	Trehalosa 250mM	771	758
Acetato 20mM	4.50	Sorbitol 250mM	808	948
			663	932
			809	796
	5.00	Sorbitol 250mM	719	732
			812	887
	5.50	Sorbitol 250mM	867	789
			718	800
			722	676
	4.50	Trehalosa 250mM	691	879
			753	851
			837	826
	5.00	Trehalosa 250mM	903	821
			1001	763
			806	826
	5.50	Trehalosa 250mM	822	841

Tabla 5

Amortiguador	pH	Excipiente	Tensioactivo	Actividad enzimática ($\mu\text{mol/min.mgE}$) congelación/ descongelación	Actividad enzimática ($\mu\text{mol/min.mgE}$) 40°C 75% RH
Tris 20 mM	8.50	Trehalosa 250mM	----	702	835
		Sorbitol 250mM		824	771
		NaCl 150mM		830	709
Fosfato 20mM	7.50	Sorbitol 250mM	0.02% PS- 80	744	
		Trehalosa 250mM		673	
Acetato 20mM	5.25	Sorbitol 250mM		618	
		Trehalosa 250mM		921	

[0153] Todas las formulaciones y condiciones de estrés se analizaron mediante SEC-HPLC. Los resultados se muestran en la **Tabla 6**. Después del estrés térmico, la pureza en las formulaciones amortiguadas con fosfato osciló de 88,70 % a 99,31 %, el pico de HMW osciló de 0,66 % a 1,00 %, el hombro de LMW osciló de ninguno detectado a 10,98 % y el pico de LMW no se detectó. A pH 7,0, los tres excipientes muestran perfiles de SEC similares después del estrés térmico, y el porcentaje de pico principal fue de 99 % para cada excipiente.

Tabla 6

pH	Excipiente	Condición	Pico HMW (%)	Pico principal (%)	Hombro LMW (%)	Pico LMW (%)	
7.0	Sorbitol 250mM	Cong./Descong.	0.68	99.32	ND	ND	
		40°C, 2W	0.99	99.01	ND	ND	
		Cong./Descong.	0.71	99.29	ND	ND	
		40°C, 2W	1.00	99.00	ND	ND	
7.5		Cong./Descong.	0.66	99.34	ND	ND	
		40°C, 2W	0.89	99.11	ND	ND	
8.0		Cong./Descong.	0.71	99.29	ND	ND	
		40°C, 2W	0.98	90.33	8.68	ND	
		Cong./Descong.	0.66	99.34	ND	ND	
		40°C, 2W	0.94	90.12	8.94	ND	
7.0		Trehalosa 250 mM	Cong./Descong.	0.66	99.34	ND	ND
			40°C, 2W	0.76	99.24	ND	ND
	Cong./Descong.		0.66	98.05	ND	1.28	
	40°C, 2W		0.75	99.25	ND	ND	
7.5	Cong./Descong.		0.68	98.47	ND	0.85	
	40°C, 2W		0.80	92.44	6.76	ND	
8.0	Cong./Descong.		0.68	99.32	ND	ND	
	40°C, 2W		0.82	91.09	8.09	ND	
	Cong./Descong.		0.68	98.44	ND	0.88	
	40°C, 2W		0.81	91.36	7.83	ND	
7.0	NaCl 150mM		Cong./Descong.	0.68	99.32	ND	ND
			40°C, 2W	0.69	99.31	ND	ND
		Cong./Descong.	0.69	99.31	ND	ND	
		40°C, 2W	0.73	99.27	ND	ND	
7.5		Cong./Descong.	0.68	99.32	ND	ND	
		40°C, 2W	0.73	92.00	7.27	ND	
8.0		Cong./Descong.	0.68	99.32	ND	ND	
		40°C, 2W	0.72	88.29	10.98	ND	
		Cong./Descong.	0.66	99.34	ND	ND	
		40°C, 2W	0.66	88.70	10.64	ND	

[0154] La disminución en la pureza del pico principal y el aumento en el porcentaje del hombro de LMW se ajustaron a un modelo lineal dependiente de pH únicamente con la pureza máxima del pico principal observada a pH 7,0 (**Tabla 7**). Las formulaciones fuera de diseño a pH 8,5 también muestran la formación de cantidades significativas de hombro de LMW después del estrés térmico (**Tabla 8**). Se encontró que la formación de especies de HMW depende del excipiente, pero no del pH, en donde el sorbitol es el que tiene el mayor porcentaje general de especies de HMW.

Tabla 7

Fuente	Suma de cuadrados	df	Cuadrado principal	Valor F	Valor p Prob > F
Modelo	253.83	1	253.83	83.28	< 0.0001
<i>A-pH</i>	253.83	1	253.83	83.28	< 0.0001
Residual	39.62	13	3.05		

Tabla 8

Amortiguador	pH	Excipiente	Tensioactivo	Condición	Pico HMW (%)	Pico principal (%)	Hombro LMW (%)	Pico LMW (%)
Tris 20mM	8.5	Trehalosa 250mM	----	Congelación/descongelación 40°C, 2W	0.66	99.34	ND	ND
		Sorbitol 250mM		Congelación/descongelación 40°C, 2W	0.71	90.41	8.88	ND
		NaCl 150mM		Congelación/descongelación 40°C, 2W	0.67	99.33	ND	ND
				Congelación/descongelación 40°C, 2W	0.79	90.18	9.04	ND
				Congelación/descongelación 40°C, 2W	0.68	99.32	ND	ND
				Congelación/descongelación 40°C, 2W	0.64	86.75	12.61	ND
Fosfato 20mM	7.5	Sorbitol 150mM	0.02% PS-80	Congelación/descongelación	0.91	99.09	ND	ND
		Trehalosa 250mM		Congelación/descongelación	0.89	99.11	ND	ND
Acetato 20mM	5.3	Sorbitol 250mM		Congelación/descongelación	0.69	97.62	ND	1.69
		Trehalosa 250mM		Congelación/descongelación	0.6	97.77	ND	1.63

[0155] En estrés de congelación/descongelación para las formulaciones de fosfato de sodio, la pureza del pico principal de SEC-HPLC varió de 98,05 % a 99,34 %, el pico de HMW varió de 0,66 % a 0,71 % y el pico de LMW varió de ninguno detectado a 1,28 %. No se encontraron tendencias para SEC en estrés de congelación/descongelación, pero el pico de LMW solo se observó en formulaciones de trehalosa.

[0156] En estrés de congelación/descongelación para las formulaciones de acetato de sodio, la pureza del pico principal de SEC-HPLC varió de 97,69 % a 98,07 %, el pico de HMW varió de 0,54 % a 0,69 % y el pico de LMW varió de 1,34 % a 1,62 %. Los

resultados se muestran en la **Tabla 9**. No se encontraron tendencias para SEC en estrés de congelación/descongelación. En estrés térmico, la pureza de las formulaciones de acetato de sodio varió de 97,65 % a 98,02 %, el pico de HMW varió de 0,46 % a 0,68 % y el pico de LMW varió de 1,52 % a 1,82 %. Se encontró que las pequeñas diferencias en el porcentaje de HMW dependían del pH y del excipiente con especies de HMW más altas a pH 5,5 y más para el cloruro de sodio que para la trehalosa o el sorbitol.

Tabla 9

pH	Excipiente	Condición	Pico HMW (%)	Pico principal (%)	Hombro LMW (%)	Pico LMW (%)
4.5	Sorbitol 250mM	Congelación/ descongelación	0.61	98.05	ND	1.34
		40°C, 2 P	0.49	97.84	ND	1.67
		Congelación/ descongelación	0.58	98.07	ND	1.35
		40°C, 2 P	0.46	97.94	ND	1.60
5.0		Congelación/ descongelación	0.54	98.06	ND	1.41
		40°C, 2 P	0.49	97.85	ND	1.66
5.5		Congelación/ descongelación	0.56	98.00	ND	1.44
		40°C, 2 P	0.57	97.83	ND	1.59
	Congelación/ descongelación	0.55	98.01	ND	1.44	
	40°C, 2 P	0.56	97.91	ND	1.53	
4.5	Trehalosa 250mM	Congelación/ descongelación	0.59	98.06	ND	1.35
		40°C, 2 P	0.47	97.85	ND	1.68
		Congelación/ descongelación	0.58	98.05	ND	1.37
		40°C, 2 P	0.46	98.02	ND	1.52
5.0		Congelación/ descongelación	0.55	98.02	ND	1.43
		40°C, 2 P	0.49	97.79	ND	1.71
5.5		Congelación/ descongelación	0.56	98.00	ND	1.44
		40°C, 2 P	0.54	97.82	ND	1.64
	Congelación/ descongelación	0.55	98.03	ND	1.42	
	40°C, 2 P	0.51	97.86	ND	1.63	
4.5	NaCl 150mM	Congelación/ descongelación	0.63	97.94	ND	1.42
		40°C, 2 P	0.54	97.88	ND	1.58
		Congelación/ descongelación	0.63	97.90	ND	1.46
		40°C, 2 P	0.53	97.65	ND	1.82
5.0		Congelación/ descongelación	0.67	97.90	ND	1.43
		40°C, 2 P	0.61	97.76	ND	1.63
5.5		Congelación/ descongelación	0.68	97.83	ND	1.49
		40°C, 2 P	0.68	97.74	ND	1.58
	Congelación/ descongelación	0.69	97.69	ND	1.62	
	40°C, 2 P	0.67	97.72	ND	1.60	

[0157] Todas las formulaciones y condiciones de estrés se analizaron mediante IEX-HPLC. Después del estrés térmico, las formulaciones de amortiguador de fosfato mostraron un rango de pureza pico principal de 52,9 % a 63,1 %, las especies ácidas de 9,3 % a 18,8 % y las especies básicas de 25,2 % a 30,1 %. La cantidad de especies ácidas aumentó, mientras que el pico principal disminuyó al aumentar el pH. El porcentaje de pico principal también dependió del tipo de excipiente. Los resultados

se muestran en la **Tabla 10** y la **Tabla 11**.

Tabla 10

pH	Excipiente	Condición	Pico HMW (%)	Pico principal (%)	Hombro LMW (%)	Pico LMW (%)
4.5	Sorbitol 250mM	Congelación/ descongelación	0.61	98.05	ND	1.34
		40°C, 2P	0.49	97.84	ND	1.67
		Congelación/ descongelación	0.58	98.07	ND	1.35
		40°C, 2P	0.46	97.94	ND	1.60
5.0		Congelación/ descongelación	0.54	98.06	ND	1.41
		40°C, 2P	0.49	97.85	ND	1.66
5.5		Congelación/ descongelación	0.56	98.00	ND	1.44
		40°C, 2P	0.57	97.83	ND	1.59
	Trehalosa 250mM	Congelación/ descongelación	0.55	98.01	ND	1.44
		40°C, 2P	0.56	97.91	ND	1.53
Congelación/ descongelación		0.59	98.06	ND	1.35	
40°C, 2P		0.47	97.85	ND	1.68	
5.0		Congelación/ descongelación	0.58	98.05	ND	1.37
		40°C, 2P	0.46	98.02	ND	1.52
5.5		Congelación/ descongelación	0.55	98.02	ND	1.43
		40°C, 2P	0.49	97.79	ND	1.71
	NaCl 150mM	Congelación/ descongelación	0.56	98.00	ND	1.44
		40°C, 2P	0.54	97.82	ND	1.64
5.5		Congelación/ descongelación	0.55	98.03	ND	1.42
		40°C, 2P	0.51	97.86	ND	1.63
	Congelación/ descongelación	0.63	97.94	ND	1.42	
	40°C, 2P	0.54	97.88	ND	1.58	
	5.0	Congelación/ descongelación	0.63	97.90	ND	1.46
		40°C, 2P	0.53	97.65	ND	1.82
	5.5	Congelación/ descongelación	0.67	97.90	ND	1.43
		40°C, 2P	0.61	97.76	ND	1.63
Congelación/ descongelación		0.68	97.83	ND	1.49	
40°C, 2P		0.68	97.74	ND	1.58	
5.5	Congelación/ descongelación	0.69	97.69	ND	1.62	
	40°C, 2P	0.67	97.72	ND	1.60	

Tabla 11

Amortiguador	pH	Excipiente	Especies ácidas (%)	Pico principal (%)	Especies básicas (%)	Pico principal RT (min)
Fosfato 20mM	7.0	Sorbitol 250mM	13.5	57.5	29.0	18.6
			13.3	57.2	29.5	18.6
			15.3	55.7	29.0	18.6
			18.6	53.2	28.2	18.6
			18.8	52.9	28.3	18.6
	7.5	Trehalosa 250mM	10.6	59.3	30.1	18.7
			10.3	59.9	29.9	18.7
			12.8	57.8	29.4	18.6
			15.0	55.7	29.3	18.6
			17.7	57.0	25.2	18.6
	8.0	NaCl 150mM	9.5	63.1	27.3	18.7
			9.3	62.1	28.6	18.6
			11.9	59.2	28.9	18.7
			13.8	56.6	29.6	18.7
			15.5	56.1	28.4	18.7
Acetato 20mM	4.5	Sorbitol 250mM	6.5	54.6	38.8	18.7
			6.2	54.1	39.7	18.7
			6.1	54.0	39.9	18.7
			6.6	55.2	38.2	18.7
			6.5	55.3	38.2	18.7
	5.0	Trehalosa 250mM	6.4	53.6	40.0	18.7
			6.3	54.5	39.2	19.3
			6.2	55.2	38.6	19.3
			6.2	56.3	37.5	19.3
			5.9	53.3	40.8	19.2
	5.5	NaCl 150mM	7.3	51.4	41.3	19.2
			7.1	51.3	41.6	19.2
			6.2	52.1	41.8	19.2
			6.3	56.4	37.2	19.2
			6.2	54.1	39.7	19.2

[0158] A pH 7,0, el porcentaje del pico principal fue 62,1-63,1 %, 59,3-59,9 % y 57,2-57,5 % para cloruro de sodio, trehalosa y sorbitol, respectivamente. No se observó ninguna tendencia en la cantidad de especies básicas sometidas a estrés térmico. Se observó una tendencia similar para el pH para el pico principal y los porcentajes de especies ácidas para estas formulaciones en estrés de congelación/descongelación (**Tabla 12**), pero se observó poca diferencia entre los excipientes.

Tabla 12

Amortiguador	pH	Excipiente	Especies ácidas (%)	Pico principal (%)	Especies básicas (%)	Pico principal (%)
Fosfato 20mM	7.0	Sorbitol 250mM	7.8	69.5	22.7	19.2
			7.5	69.4	23.1	19.2
	7.5		68.5	22.9	19.2	
	8.0		10.4	67.4	22.2	19.2
			10.0	67.2	22.8	19.2
	7.0	Trehalosa 250mM	7.5	69.1	23.4	19.2
	7.3		69.5	23.2	19.2	
	7.5		9.2	64.1	26.7	19.3
	8.0		9.6	65.3	25.1	19.3
		10.9	67.4	21.7	19.3	
	7.0	NaCl 150mM	6.9	68.6	24.5	19.3
	7.1		68.6	24.3	19.3	
	7.5		8.6	66.9	24.5	19.2
	8.0		8.7	66.8	24.5	19.2
10.1			66.4	23.5	19.3	
Acetato 20mM	4.5	Sorbitol 250mM	5.5	67.7	26.8	19.2
	5.0		5.5	67.7	26.7	19.2
			5.7	68.6	25.7	19.2
	5.5		5.8	69.0	25.3	19.2
		5.8	69.4	24.8	19.2	
	4.5	Trehalosa 250mM	5.6	69.7	24.7	19.2
			5.6	69.7	24.7	19.2
	5.0		5.5	70.2	24.3	19.2
	5.5		5.5	70.4	24.1	19.2
		5.7	69.8	24.6	19.2	
	4.5	NaCl 150mM	5.4	70.4	24.1	19.2
			5.5	70.4	24.1	19.2
	5.0		5.5	70.5	24.0	19.2
	5.5		5.6	70.6	23.9	19.2
5.6		70.4	24.0	19.2		

[0159] Después del estrés térmico, la pureza de las formulaciones de amortiguador de acetato varió de 51,3 % a 56,4 %, las especies ácidas de 5,9 % a 7,3 % y las especies básicas de 37,2 % a 41,8 % (**Tabla 11** anterior). El pico principal disminuyó al disminuir el pH y el porcentaje del pico principal también dependió del tipo de excipiente. A pH 5,0, el porcentaje del pico principal fue 54,0 %, 55,2 % y 52,1 % para sorbitol, trehalosa y cloruro de sodio, respectivamente. No se observó ninguna tendencia en la cantidad de especies básicas observadas sometidas a estrés térmico. En estrés de congelación/descongelación en amortiguadores de acetato de sodio, se observó una tendencia similar con el pH y el excipiente en relación con el estrés térmico, aunque la diferencia entre formulaciones es relativamente pequeña (**Tabla 12** anterior). Los resultados de IEX-HPLC para las formulaciones fuera de diseño se encuentran en la **Tabla 13** y la **Tabla 14**.

Tabla 13

Amortiguador	pH	Excipiente	Condición	Especies ácidas (%)	Pico principal (%)	Especies básicas (%)	Pico principal (RT)
Tris 20mM	8.5	Trehalosa 250mM	40°C, 2P	13.2	57.8	29.0	19.2
		Sorbitol 250mM		14.2	57.5	28.3	19.2
		NaCl 250mM		13.4	61.6	24.9	18.6

Tabla 14

Amortiguador	pH	Excipiente	Tensioactivo	Especies ácidas (%)	Picos medios (%)	Especies básicas (%)	Pico principal (RT)
Tris 20mM	8.5	Trehalosa 250mM	----	7.5	69.6	22.8	19.2
		Sorbitol 250mM		7.0	70.1	22.9	19.2
		NaCl 250mM		7.8	69.7	22.5	19.4
Fosfato 20mM	7.5	Sorbitol 250mM	0.02% PS-80	9.2	68.1	22.7	19.4
		Trehalosa 250		8.6	68.8	22.6	19.4
Acetato 20mM	5.25	Sorbitol 250mM		6.2	69.6	24.2	19.5
		Trehalosa 250		6.2	69.3	24.5	19.5

[0160] Todas las formulaciones eran incoloras y transparentes después del vial. Después del estrés de congelación/descongelación, todas las formulaciones eran incoloras y ligeramente opalescentes (**Tabla 15**, **Tabla 16** y **Tabla 17**). En estrés térmico para las formulaciones de fosfato de sodio, se observó precipitado relacionado con el producto a pH 8,0 para sorbitol, pH 7,5 y 8,0 para trehalosa y en todas las formulaciones de cloruro de sodio. Para las formulaciones de acetato de sodio, se observaron partículas en todas las formulaciones excepto en sorbitol 250 mM a pH 4,5 y trehalosa 250 mM a pH 5,5.

Tabla 15

pH	Excipiente	Congelación/ descongelación			40°C/75% RH		
		Color	Claridad	Partículas	Color	Claridad	Partículas
7.0	Sorbitol 250mM	Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles
		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles
7.5		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles
8.0		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles
		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Levemente opalescente	Si
7.0	Trehalosa 250mM	Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles
		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles
7.5		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Levemente opalescente	Si
8.0		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Levemente opalescente	Si
		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Levemente opalescente	Si
7.0	NaCl 150mM	Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Levemente opalescente	Si
		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Levemente opalescente	Si
7.5		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Parcialmente nublado	Si
8.0		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Parcialmente nublado	Si
		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Parcialmente nublado	Si

Tabla 16

pH	Excipiente	Congelación/ descongelación			40°C/75% RH		
		Color	Claridad	Partículas	Color	Claridad	Partículas
4.5	Sorbitol 250mM	Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles
		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles
5.0		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Levemente opalescente	Si
5.5		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Levemente opalescente	Si
		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Levemente opalescente	Si
4.5	Trehalosa 250mM	Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Levemente opalescente	Si
		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles
5.0		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Levemente opalescente	Si
5.5		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles
		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles
4.5	NaCl 150mM	Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Nublado	Precipitado
		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Nublado	Precipitado
5.0		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Parcialmente nublado	Precipitado
5.5		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Parcialmente nublado	Si
		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Parcialmente nublado	Si

Tabla 17

Amortiguador	pH	Excipiente	Tensioactivo	Congelación/descongelación			40°C/75% RH		
				Color	Claridad	Partículas	Color	Claridad	Partículas
Tris 20mM	8.5	Trehalosa 250mM	----	Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Parcialmente nublado	Sin partículas visibles
		Sorbitol 250mM		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Parcialmente nublado	Sin partículas visibles
		NaCl 150mM		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles	Sin color	Parcialmente nublado	SI
Fosfato 20mM	7.5	Sorbitol 250mM	0.02% PS-80	Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles			
		Trehalosa 250mM		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles			
Acetato 20mM	5.3	Sorbitol 250mM		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles			
		Trehalosa 250mM		Sin color	Levemente opalescente	Sin partículas visibles			

[0161] Los datos analíticos de las formulaciones amortiguadas con fosfato de sodio en estrés térmico se seleccionaron para análisis adicionales debido al grado de diferencia entre las formulaciones y la experiencia histórica del cliente con RC en amortiguadores de fosfato. Los resultados de las pruebas SEC, IEX y de apariencia mostraron una tendencia clara en el pH para la estabilidad de la formulación, en donde el excipiente mostró un efecto menor para las formulaciones a pH 7,0.

[0162] La optimización numérica se realizó para las formulaciones de fosfato de sodio en estrés térmico mediante el uso de Stat-Ease, Inc. Design-Expert® Versión 9.0.6.2 para maximizar los porcentajes de los picos principales SEC e IEX y minimizar la formación de especies LMW y HMW en SEC y especies ácidas y básicas en IEX. La optimización numérica se realizó en los resultados analíticos del DOE de fosfato de sodio 20 mM después de 2 semanas de estrés térmico. La optimización de la formulación se realizó para encontrar la formulación óptima sin restricciones de pH o excipiente. Los parámetros y resultados de optimización se encuentran en la **Tabla 18**, **Tabla 19**, **Tabla 20** y **Tabla 21**. Cuando se dio la misma importancia a la presencia de partículas en las formulaciones utilizadas como respuesta y a todos los resultados, se calculó que la formulación óptima era fosfato de sodio 20 mM, trehalosa 250 mM a pH 7,2. Si la aparición de partículas en la formulación no es un factor limitante en la optimización y a todos los resultados se les dio la misma importancia, se calculó que la formulación óptima era fosfato de sodio 20 mM y cloruro de sodio 150 mM a pH 7,0. Con base en las formulaciones DOE y fuera de DOE, se seleccionó fosfato de sodio

20 mM, trehalosa 250 mM, pH 7,0 a 20 mg/ml RC para pruebas adicionales en el estudio de surfactante.

Tabla 18

Nombre	Objetivo	Límite inferior	Límite superior	Peso inferior	Peso superior	Importancia
A:pH	se encuentra en rango	7	8	1	1	3
B:Excipiente	se encuentra en rango	Sorbitol	NaCl	1	1	3
SEC (HMW)	minimiza	0.66	1	1	1	3
SEC (principal)	maximiza	88.29	99.31	1	1	3
SEC (LMW)	minimiza	0	10.98	1	1	3
IEX ácido %	minimiza	9.2587	18.7732	1	1	3
IEX %pico principal	maximiza	52.9391	63.1144	1	1	3
IEX básico %	minimiza	25.2444	30.0589	1	1	3

Tabla 19

Número	pH	Excipiente	SEC % HMW	SEC % Main	SEC % LMW	IEX % ácido	IEX % pico principal	IEX básico %	Deseabilidad
1	7.0	NaCl	0.705	99.167	0.016	9.25	62.55	28.07	0.833
2	7.3	Trehalosa	0.788	96.394	2.788	12.20	58.57	29.32	0.521

Nombre	Objetivo	Límite inferior	Límite superior	Peso inferior	Peso superior	Importancia
A:pH	se encuentra en rango	7	8	1	1	3
B:Excipiente	se encuentra en rango	Sorbitol	NaCl	1	1	3
SEC (HMW)	minimiza	0.66	1	1	1	3
SEC (principal)	maximiza	88.29	99.31	1	1	3
SEC (LMW)	minimiza	0	10.98	1	1	3
IEX ácido %	minimiza	9.2587	18.7732	1	1	3
IEX %pico principal	maximiza	52.9391	63.1144	1	1	3
IEX básico %	minimiza	25.2444	30.0589	1	1	3
Partículas	minimiza	0	1	1	1	3

Tabla 20

Tabla 21

Número	pH	Excipiente	SEC % HMW	SEC % principal	SEC % LMW	IEX % ácido	IEX % pico principal	IEX básico %	Partículas	Deseabilidad
1	7.2	Trehalosa	0.788	97.037	2.145	11.82	58.79	29.51	0.332	0.536
2	7.0	Sorbitol	0.959	99.167	0.016	13.16	57.44	29.31	-0.050	0.467

Ejemplo 3: Estudio de tensioactivo

[0163] Se realizó un estudio de detección de tensioactivo para evaluar el impacto de la concentración de PS-80 en la opalescencia observada después de la congelación/descongelación o el estrés por agitación. La L-asparaginasa se formuló en fosfato de sodio 20 mM a pH 6,5, 7,0 y 7,5 con trehalosa 250 mM en concentraciones

de PS-80 entre 0,00 % y 0,06 % p/v (**Tabla 22**). Como formulación alternativa, se incluyó acetato de sodio 20 mM, trehalosa 250 mM a pH 5,5 con 0,00 % y 0,04 % p/v de PS-80.

Tabla 22

Amortiguador	Excipiente	pH	PS-80 (%)	Punto temporal/ condición	Concentración (mg/mL)
Fosfato de sodio 20mM	Trehalosa 250mM	7.0	0.00%	T0	20
				1 F/T	21
				3 F/T	21
				0 H control de agitación	21
				24 H agitación	21
				48 H agitación	21
			0.02%	T0	21
				1 F/T	21
				3 F/T	21
				0 H control de agitación	21
				24 H agitación	21
				48 H agitación	21
			0.04%	T0	22
				1 F/T	22
				3 F/T	22
				0 H control de agitación	22
				24 H agitación	22
				48 H agitación	22
			0.06%	T0	22
				1 F/T	21
				3 F/T	22
				0 H control de agitación	22
				24 H agitación	22
				48 H agitación	22
		6.5	0.04%	T0	20
				1 F/T	20
				3 F/T	20
				0 H control de agitación	19
				24 H agitación	20
				48 H agitación	20
			7.5	T0	21
				1 F/T	21
				3 F/T	21
				0 H control de agitación	21
				24 H agitación	21
				48 H agitación	21

Tabla 22 (Continuación)

Amortiguador	Excipiente	pH	PS-80 (%)	Punto/condición de tiempo	Concentración (mg/ML)
Acetato de sodio 20 mM	Trehalose 250 mM	5.5	0.00%	T0	20
				1 F/T	20
				3 F/T	20
				0H Control de agitación	20
				24 H Agitación	20
				48 H Agitación	20
			0.04%	T0	21
				1 F/T	21
				3 F/T	21
				0H Control de agitación	21
				24 H Agitación	21
				48 H Agitación	21

[0164] Se dializó L-asparaginasa (a 22 mg/ml, 1760 mg) en los amortiguadores de formulación correspondientes sin PS-80 mediante el uso de casetes de diálisis Slide-A-Lyzer G2 de 10 K MWCO. La diálisis se realizó a temperatura ambiente con un amortiguador de formulación mínimo para un volumen de muestra de 40:1. Se realizaron cuatro intercambios de amortiguador de diálisis. Después de la diálisis, se retiró el material de los casetes y se midieron la concentración y el pH. Luego se dividió el material y se agregó PS-80 a la concentración apropiada mediante el uso de una solución de PS-80 al 10 % (p/v) en H₂O. Después de mezclar, cada una de las formulaciones se dividirá en partes iguales en seis viales de 2 ml.

[0165] Un vial de cada formulación se mantuvo a 5 °C para la prueba inicial (8 en total) durante la evaluación de congelación-descongelación y agitación. Se realizaron uno y tres ciclos de congelación-descongelación de forma independiente en viales separados de cada formulación. Cada ciclo de congelación-descongelación se congeló a -75 ± 10 °C durante un mínimo de 2 horas y se descongeló a temperatura ambiente durante un mínimo de 2 horas y hasta que se descongeló por completo. Se necesitaron tres viales de cada formulación para la evaluación de la agitación (24 en total). Un vial se agitó en un rotador a 60 rpm a temperatura ambiente durante 24 horas, un vial durante 48 horas en las mismas condiciones y un vial se colocó junto al rotador durante la duración del estudio como control.

[0166] El estudio del tensioactivo se realizó para evaluar el impacto del PS-80 en el desarrollo de opalescencia en estrés de congelación/descongelación o agitación para

formulaciones de RC en fosfato 20 mM, trehalosa 250 mM a pH 6,5, 7,0 y 7,5 con 0,00 %, 0,02 %, 0,04 % y 0,06 % de PS-80 (**Tabla 22**). Se agregaron al estudio dos formulaciones adicionales como posibles alternativas de amortiguador: acetato 20 mM, trehalosa 250 mM a pH 5,5 con 0,00 % y 0,04 % p/v de PS-80. Luego, las formulaciones se expusieron a 1 y 3 ciclos de congelación/descongelación a -75 °C y se estresaron con agitación durante 24 y 48 horas a temperatura ambiente. Los controles para cada formulación se mantuvieron a 5 °C para el estrés de congelación/descongelación y temperatura ambiente durante 48 horas sin agitación.

[0167] En las pruebas de apariencia, todas las muestras de control y estresadas eran incoloras y ligeramente opalescentes sin partículas relacionadas con el producto. No se observó diferencia en el grado de opalescencia entre las muestras de control y las muestras de congelación/descongelación y agitación o los diferentes niveles de PS-80. También se evaluó la concentración de proteína para los controles y las formulaciones estresadas. La concentración de proteína estuvo entre 19 y 22 mg/ml (**Tabla 22**). No se observaron cambios o tendencias significativas durante la congelación/descongelación o el estrés por agitación.

[0168] El análisis DLS mostró que todas las muestras tenían un radio hidrodinámico entre 4,1 y 4,5 con un porcentaje de polidispersidad entre 10,7 % y 19,4 % (**Tabla 23** y **Tabla 24**). No se observaron diferencias o tendencias significativas en el DLS en relación con la formulación o la condición de estrés.

Tabla 23

pH	PS-80 (%)	Punto temporal/ condición	Radio promedio (nm)	% promedio pd
7.0	0.00%	T0	4.2	15.5
		1 F/T	4.3	18.4
		3 F/T	4.3	16.7
		48H control de agitación	4.4	17.6
		24H agitación	4.3	14.8
		48H agitación	4.4	16.6
	0.02%	T0	4.4	15.4
		1 F/T	4.4	15.6
		3 F/T	4.3	14.4
		48H control de agitación	4.5	19.4
		24H agitación	4.4	16.7
		48H agitación	4.4	14.5
7.0	0.04%	T0	4.5	16.3
		1 F/T	4.3	12.2
		3 F/T	4.3	16.3
		48H control de agitación	4.4	17.2
		24H agitación	4.4	15.4
		48H agitación	4.3	14.7
	0.06%	T0	4.4	16.6
		1 F/T	4.4	14.2
		3 F/T	4.4	17.3
		48H control de agitación	4.4	14.9
		24H agitación	4.4	14.0
		48H agitación	4.5	17.3
6.5	0.04%	T0	4.3	16.1
		1 F/T	4.2	11.6
		3 F/T	4.3	13.1
		48H control de agitación	4.3	10.7
		24H agitación	4.3	13.7
		48H agitación	4.3	12.9
7.5	0.04%	T0	4.2	17.1
		1 F/T	4.3	15.7
		3 F/T	4.3	13.6
		48H control de agitación	4.3	14.3
		24H agitación	4.3	12.6
		48H agitación	4.3	14.6

Tabla 24

pH	PS-80 (%)	Punto temporal/ condición	Radio promedio (nm)	% Pd promedio
5.5	0.00%	T0	4.3	14.6
		1 F/T	4.4	14.2
		3 F/T	4.3	14.0
		48H control de agitación	4.1	14.4
		24H agitación	4.1	15.6
		48H agitación	4.2	15.2
	0.04%	T0	4.3	16.6
		1 F/T	4.3	15.0
		3 F/T	4.4	15.5
		48H control de agitación	4.3	16.3
		24H agitación	4.4	16.5
		48H agitación	4.4	16.3

[0169] Los resultados de SEC-HPLC muestran que todas las formulaciones, independientemente del estrés, en amortiguador de fosfato 20 mM tenían perfiles similares con el porcentaje del pico principal del 99,3 % y un pico de HMW del 0,7 % antes y después de las condiciones de estrés (**Tabla 25**). De manera similar, la SECHPLC de las formulaciones de acetato 20 mM mostró un pico de HMW del 0,7 %, entre 97,9 % y 98,1 % del pico principal y entre 1,3 % y 1,4 % de un pico de LMW (**Tabla 26**).

Tabla 25

pH	PS-80 (%)	Condición	Pico HMW (%)	Pico RC (%)	Pico LMW (%)
7.0	0.00%	T0	0.71	99.29	ND
		1 F/T	0.70	99.30	ND
		3 F/T	0.70	99.30	ND
		48H control de agitación	0.69	99.31	ND
		24H agitación	0.71	99.29	ND
		48H agitación	0.71	99.29	ND
	0.02%	T0	0.72	99.28	ND
		1 F/T	0.71	99.29	ND
		3 F/T	0.72	99.28	ND
		48H control de agitación	0.71	99.29	ND
		24H agitación	0.72	99.28	ND
		48H agitación	0.72	99.28	ND
7.0	0.04%	T0	0.71	99.29	ND
		1 F/T	0.71	99.29	ND
		3 F/T	0.71	99.29	ND
		48H control de agitación	0.71	99.29	ND
		24H agitación	0.70	99.30	ND
		48H agitación	0.71	99.29	ND
	0.06%	T0	0.72	99.28	ND
		1 F/T	0.72	99.28	ND
		3 F/T	0.73	99.27	ND
		48H control de agitación	0.71	99.29	ND
		24H agitación	0.70	99.30	ND
		48H agitación	0.72	99.28	ND
6.5	0.04%	T0	0.70	99.30	ND
		1 F/T	0.66	99.34	ND
		3 F/T	0.71	99.29	ND
		48H control de agitación	0.70	99.30	ND
		24H agitación	0.70	99.30	ND
		48H agitación	0.70	99.30	ND
7.5		T0	0.73	99.27	ND
		1 F/T	0.73	99.27	ND
		3 F/T	0.71	99.29	ND
		48H control de agitación	0.72	99.28	ND
		24H agitación	0.73	99.27	ND
		48H agitación	0.72	99.28	ND

Tabla 26

pH	PS-80 (%)	Condición	Pico HMW (%)	Pico RC (%)	Pico LMW (%)
5.5	0.00%	T0	0.68	97.95	1.37
		1 F/T	0.68	98.00	1.33
		3 F/T	0.69	98.01	1.30
		48H Agitation Control	0.67	98.01	1.32
		24H Agitation	0.66	98.06	1.27
		48H Agitation	0.67	98.00	1.34
	0.04%	T0	0.68	98.03	1.29
		1 F/T	0.68	97.92	1.40
		3 F/T	0.70	97.94	1.36
		48H Agitation Control	0.68	98.00	1.32
		24H Agitation	0.68	97.99	1.33
		48H Agitation	0.69	97.97	1.34

[0170] Las partículas subvisibles se midieron mediante HIAC para las muestras T0, 1 ciclo de congelación/descongelación, 3 ciclos de congelación/descongelación, control de agitación, agitación de 24 horas y agitación de 48 horas con concentraciones variables de PS-80. Los resultados se resumen en la **Tabla 27** y la **Tabla 28**. Para todas las muestras, los recuentos acumulados/ml oscilaron entre 2330 – 45270, 390 – 35857, 78 – 6430 y 0 – 150 para $\geq 2 \mu\text{m}$, $5 \mu\text{m}$, $\geq 10 \mu\text{m}$, $\geq 25 \mu\text{m}$, respectivamente. Algunas condiciones tenían niveles elevados de partículas en relación con otras condiciones de la misma formulación, pero estas muestras parecen ser valores atípicos en lugar de representar una tendencia. Por ejemplo, una solución de fosfato 20 mM, trehalosa 250 mM, PS-80 al 0,04 %, pH 7,0 tenía 2842 partículas $\geq 10 \mu\text{m}$ en el momento inicial, pero solo 155 partículas en el control de agitación.

Tabla 27

pH	PS-80 (%)	Punto temporal/ condición	Recuentos acumulativos / mL			
			≥ 2 µm	≥ 5 µm	≥ 10 µm	≥ 25 µm
7.0	0.00%	T0	15613	2656	522	40
		1 F/T ¹	45270	21660	6430	150
		3 F/T	8538	1447	313	8
		0 H agitación de control	18195	3640	765	37
		24 H agitación	5148	865	167	2
		48 H agitación	18402	3172	578	23
	0.02%	T0	43832	16540	3573	52
		1 F/T	4735	877	170	3
		3 F/T	5857	1027	188	12
		0 H agitación de control	3028	490	105	0
		24 H agitación	4350	815	152	2
		48 H agitación	17782	3280	498	8
	0.04%	T0	41718	14653	2842	38
		1 F/T	4887	883	173	5
		3 F/T	5700	1080	252	10
		0 H agitación de control	3123	633	155	10
		24 H agitación	9640	2122	457	13
		48 H agitación	19538	35857	660	3
	0.06%	T0	16930	2632	373	7
		1 F/T	16795	4673	1037	17
		3 F/T	6238	1172	258	5
		0 H control de agitación	7500	1602	327	8
		24 H agitación	4250	828	163	2
		48 H agitación	20525	4120	693	7
6.5	0.04%	T0	14865	1873	170	3
		1 F/T	4748	768	120	3
		3 F/T	2330	390	78	0
		0 H control de agitación	6888	963	168	10
		24 H agitación	9677	2363	495	5
		48 H agitación	11253	1483	190	7
7.5	0.04%	T0	30553	8140	1243	13
		1 F/T	7458	1168	185	5
		3 F/T	3843	643	132	2
		0 H control de agitación	2640	497	105	2
		24 H agitación	15910	2568	448	17
		48 H agitación	19282	3733	622	10

¹La prueba de la muestra se interrumpió y no se completó del todo. No obstante, las mediciones realizadas representan el resultado real de la muestra.

Tabla 28

pH	PS-80 (%)	Punto temporal/ condición	≥ 2 µm	≥ 5 µm	≥ 10 µm	≥ 25 µm
5.5	0.00%	T0	11538	1735	242	10
		1 F/T	6808	1260	218	10
		3 F/T	14612	2465	418	22
		0 H punto de agitación	8667	1432	353	23
		24 H agitación	11217	2040	353	23
		48 H agitación	16168	3152	517	20
	0.04%	T0 ¹	12550	1830	233	8
		1 F/T	6282	1172	148	5
		3 F/T	12148	2190	423	13
		0 H punto de agitación	2955	600	110	2
		24 H agitación	10077	1700	215	0
		48 H agitación	14297	2437	315	3

[0171] Se realizó IEX-HPLC para todas las formulaciones de fosfato 20 mM en todas las condiciones. El porcentaje de pico principal para el control T0 a pH 7,0 con 0 %, 0,02 %, 0,04 % y 0,06 % de PS-80 fue 68,88 %, 69,83 %, 71,36 % y 70,38 %, respectivamente (**Tabla 29**). Con 0,04 % de PS-80, el porcentaje de pico principal para el control T0 a pH 6,5, 7,0 y 7,5 fue 70,11 %, 71,36 % y 68,04 %, respectivamente. No se observaron cambios significativos en el perfil IEX de todas las formulaciones después de la exposición a congelación/descongelación o estrés por agitación. Estos resultados indican pocos beneficios al agregar PS-80 hasta 0,06 % p/v.

Tabla 29

pH	PS-80 (%)	Condición	Especies ácidas (%)	Pico principal (RT)	Pureza del pico principal (%)	Especies básicas (%)
7.0	0.00%	T0	11.78	19.15	68.88	19.34
		1 F/T	10.35	19.14	68.98	20.67
		3 F/T	10.01	19.13	69.24	20.75
		48H Control	10.12	19.10	68.72	21.17
		24H Agitación	9.47	19.10	69.26	21.27
		48H Agitación	9.44	19.08	69.26	21.30
	0.02%	T0	9.06	19.08	69.83	21.12
		1 F/T	8.77	19.07	70.44	20.78
		3 F/T	8.38	19.07	70.66	20.96
		48H	9.04	19.07	69.87	21.09
		24H	9.35	19.07	69.73	20.92
		48H	9.13	19.08	69.85	21.02
	0.04%	T0	8.89	19.08	71.36	19.75
		1 F/T	8.97	19.07	70.67	20.36
		3 F/T	8.98	19.07	70.94	20.08
		48H Control	9.23	19.07	70.87	19.90
		24H Agitación	8.93	19.08	71.24	19.84
		48H Agitación	9.38	19.08	70.52	20.09
	0.06%	T0	8.87	19.08	70.38	20.75
		1 F/T	9.20	19.09	70.65	20.15
		3 F/T	9.88	19.08	69.80	20.32
		48H Control	9.55	19.08	69.41	21.04
		24H Agitación	9.57	19.08	69.52	20.91
		48H Agitación	9.88	19.08	69.01	21.12
6.5	0.04%	T0	7.15	19.08	70.11	20.84
		1 F/T	8.98	19.08	70.16	20.86
		3 F/T	9.29	19.09	69.64	21.07
		48H Control	9.50	19.09	69.25	21.25
		24H Agitación	9.23	19.08	69.67	21.11
		48H Agitación	9.78	19.08	68.92	21.30
7.5	0.04%	T0	11.32	19.08	68.04	20.64
		1 F/T	10.78	19.08	68.65	20.56
		3 F/T	10.70	19.08	68.79	20.51
		48H Control	10.91	19.09	68.07	21.02
		24H Agitación	10.57	19.08	69.05	20.38
		48H Agitación	10.82	19.08	68.18	21.00

Ejemplo 4: Estudio de dependencia de sal/trehalosa

[0172] El estudio de dependencia de sal/trehalosa de preformación realizado con 22 mg/ml de L-asparaginasa se formuló en nueve amortiguadores de formulación diferentes, de acuerdo con **Tabla 30**. Una alícuota de 27 ml del lote RE-LAP-P59 se dividió en 6 porciones de alrededor de 3 ml (3 porciones) y 6 ml (3 porciones). Se realizó un intercambio de amortiguador para las formulaciones 1-6 mediante diálisis con el uso de casetes Slide-A-Lyzer G2 de 10K MWCO. La diálisis se realizó a

temperatura ambiente en una proporción mínima de amortiguador a volumen de muestra de 40:1. Se realizaron cuatro intercambios de amortiguador de diálisis para cada formulación aproximadamente cada 2 horas, en donde un intercambio se realizó durante la noche.

Tabla 30

Formulación	Amortiguador	Trehalosa (mM)	NaCl (mM)	PS-80% (w/v)	Lot RE-LAP-P59 Volumen a dializar
F1	Fosfato 20mM Na	175	0	----	6 mL
F2			50		6 mL
F3			100		6 mL
F4	Fosfato 50mM Na		0		3 mL
F5			50		3 mL
F6			100		3 mL
F7	Fosfato 20mM Na		0	0.02	Sin diálisis
F8			50		Sin diálisis
F9			100		Sin diálisis

[0173] Después de la diálisis, se retiró el material de los casetes de diálisis y se confirmaron el pH y la concentración de proteínas. Luego se ajustó la concentración de las muestras a 20 ± 2 mg/ml con el amortiguador correspondiente. Después del ajuste, el material de los amortiguadores 1-3 se dividió en porciones iguales de 3 ml cada una. Un conjunto de estas alícuotas se complementó con 10 % de PS-80 hasta una concentración final de 0,02 %. Luego, todas las muestras se filtraron y se envasaron en una cabina de bioseguridad. Un conjunto de formulaciones se almacenó a 5 °C hasta la prueba para la evaluación inicial de la calidad del material, un conjunto se almacenó a 5 °C durante 3 semanas y un conjunto se sometió a estrés térmico a 40 °C durante 3 semanas. Se seleccionó el punto temporal de 3 semanas después de una evaluación del aspecto visual después de 1,5 semanas de almacenamiento a 40 °C. Las formulaciones uno y dos a 5 °C se probaron adicionalmente mediante HPLC IEX y SEC después de siete semanas.

[0174] El estudio de dependencia de sal/trehalosa se realizó para evaluar el impacto de la concentración de cloruro de sodio en formulaciones de L-asparaginasa en fosfato 20 mM o 50 mM, trehalosa 175 mM, a pH 7,0 con y sin PS-80 al 0,02 % (**Tabla 30**). Las formulaciones se expusieron durante 1,5 y 3 semanas a 5 °C y 40 °C. Se utilizaron exclusión por tamaño y cromatografía IEX para evaluar la estabilidad de RC en presencia de estas concentraciones variables de sal en los amortiguadores seleccionados. La osmolalidad y la conductividad también se determinaron en el momento inicial y se muestran en la **Tabla 31**.

Tabla 31

Amortiguador	Excipiente 1	Excipiente 2	PS-80 % (p/v)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Conductividad (mS/cm)
Fosfato 20mM Na	Trehalosa 175mM	----	----	7.0	240	2.3
		NaCl 50mM Na	----		336	7.0
		NaCl 100mM Na	----		428	11.7
----		----	305		5.3	
NaCl 50mM Na		----	401		10.0	
NaCl 100mM Na		----	498		14.5	
Fosfato 50mM Na		----	0.02		242	2.4
		NaCl 50mM Na	0.02		336	7.1
		NaCl 100mM Na	0.02		431	11.8

[0175] En las pruebas de apariencia, todas las muestras iniciales y estresadas eran incoloras y ligeramente opalescentes con muy pocas o ninguna partícula relacionada con el producto. Todas las formulaciones se volvieron más opalescentes en función del estrés. Las formulaciones que contenían PS-80 al 0,02 % no tenían partículas presentes independientemente de la duración del almacenamiento (**Tabla 32**). Este resultado indica que la adición de 0,02 % de PS-80 puede retrasar la formación de partículas durante el almacenamiento a largo plazo. No hubo dependencia de la apariencia de la concentración de sal. También se evaluó la concentración de proteína para las formulaciones iniciales y estresadas. La concentración de proteína estuvo entre 19,7 y 25,2 mg/ml (**Tabla 33**). No se observaron cambios o tendencias significativas en las muestras estresadas.

Tabla 32

Amortiguador	Excipiente 1	Excipiente 2	PS-80 % (w/v)	pH	Punto temporal	Condición	Color	Claridad	Partículas			
Fosfato 20mM Na	Trehalosa 175mM	----	----	7.0	T0	N/A	Líquido incoloro	Líquido claro	Libre de partículas visibles			
					1.5P	40°C	Líquido incoloro	La opalescencia no es más pronunciada que la suspensión de referencia IV	Libre de partículas visibles			
					3P	40°C	Líquido incoloro	La opalescencia no es más pronunciada que la suspensión de referencia IV	Libre de partículas visibles			
		NaCl 50mM	----		T0	N/A	Líquido incoloro	Líquido claro	Muy pocas partículas			
					1.5P	40°C	Líquido incoloro	La opalescencia no es más pronunciada que la suspensión de referencia IV	Libre de partículas visibles			
					3P	40°C	Líquido incoloro	La opalescencia no es más pronunciada que la suspensión de referencia IV	Libre de partículas visibles			
		NaCl 100mM	----		T0	N/A	Líquido incoloro	Líquido claro	Muy pocas partículas			
					1.5P	40°C	Líquido incoloro	La opalescencia no es más pronunciada que la suspensión de referencia IV	Libre de partículas visibles			
					3P	40°C	Líquido incoloro	La opalescencia no es más pronunciada que la suspensión de referencia IV	Libre de partículas visibles			
		----	----		T0	N/A	Líquido incoloro	Líquido claro	Muy pocas partículas			
					1.5P	40°C	Líquido incoloro	La opalescencia no es más pronunciada que la suspensión de referencia IV	Libre de partículas visibles			
					3P	40°C	Líquido incoloro	La opalescencia no es más pronunciada que la suspensión de referencia IV	Libre de partículas visibles			
Fosfato 50mM Na	Trehalosa 175mM	NaCl 50mM	----	7.0	T0	N/A	Líquido incoloro	Líquido claro	Libre de partículas visibles			
					1.5P	40°C	Líquido incoloro	La opalescencia no es más pronunciada que la suspensión de referencia IV	Libre de partículas visibles			
					3P	40°C	Líquido incoloro	La opalescencia no es más pronunciada que la suspensión de referencia IV	Libre de partículas visibles			
		NaCl 100mM	----		T0	N/A	Líquido incoloro	Líquido claro	Muy pocas partículas			
					1.5P	40°C	Líquido incoloro	La opalescencia no es más pronunciada que la suspensión de referencia IV	Libre de partículas visibles			
					3P	40°C	Líquido incoloro	La opalescencia no es más pronunciada que la suspensión de referencia IV	Libre de partículas visibles			
		----	----		T0	N/A	Líquido incoloro	Líquido claro	Muy pocas partículas			
					1.5P	40°C	Líquido incoloro	La opalescencia no es más pronunciada que la suspensión de referencia IV	Libre de partículas visibles			
					3P	40°C	Líquido incoloro	La opalescencia no es más pronunciada que la suspensión de referencia IV	Libre de partículas visibles			
		Fosfato 20mM Na	Trehalosa 175mM		NaCl 50mM	0.02	7.0	T0	N/A	Líquido incoloro	Líquido claro	Libre de partículas visibles
								1.5P	40°C	Líquido incoloro	La opalescencia no es más pronunciada que la suspensión de referencia IV	Libre de partículas visibles
								3P	40°C	Líquido incoloro	La opalescencia no es más pronunciada que la suspensión de referencia IV	Libre de partículas visibles
NaCl 100mM	0.02			T0	N/A	Líquido incoloro		Líquido claro	Libre de partículas visibles			
				1.5P	40°C	Líquido incoloro		La opalescencia no es más pronunciada que la suspensión de referencia IV	Libre de partículas visibles			
				3P	40°C	Líquido incoloro		La opalescencia no es más pronunciada que la suspensión de referencia IV	Libre de partículas visibles			

Tabla 33

Formulación	Amortiguador	Excipiente 1	Excipiente 2	PS-80 % (w/v)	Punto temporal	Condición	Concentración promedio (mg/mL)
F1	Fosfato 20mM Na	Trehalosa 175mM	----	----	T0	N/A	20.4
F2					3P	5°C	24.1
						40°C	23.2
			T0		N/A	19.7	
			3P		5°C	21.6	
					40°C	22.8	
F3	NaCl 100mM		T0		N/A	23.7	
			3P		40°C	22.9	
F4	----		T0		N/A	22.4	
			3P		40°C	23.6	
F5	NaCl 50mM		T0		N/A	22.5	
			3P		40°C	22.7	
F6	NaCl 100mM	T0	N/A	21.7			
		3P	40°C	25.2			
F7	Fosfato 20mM Na	----	0.02	T0	N/A	22.9	
				3P	40°C	24.2	
NaCl 50mM		0.02	T0	N/A	22.5		
			3P	40°C	23.5		
NaCl 100mM		0.02	T0	N/A	22.7		
			3P	40°C	24.0		

[0176] Los resultados de IEX-HPLC en el momento inicial mostraron perfiles similares con porcentajes de pico principal entre 64,1 % y 66,4 %, porcentajes de especies ácidas entre 5,9 % y 7,5 % y porcentajes de especies básicas entre 27,7 % y 28,7 %. Después de tres semanas a 40 °C, las muestras mostraron diferencias significativas en los perfiles de heterogeneidad de carga con porcentajes de picos principales entre 35,0 % y 42,3 %, porcentajes de especies ácidas entre 22,5 % y 32,0 % y porcentajes de especies básicas entre 33,0 % y 36,2 %. Después de 7 semanas a 5 °C, solo se observó una ligera variación con porcentajes de picos principales entre 59,3 % y 61,3 %, porcentajes de especies ácidas entre 9,7 % y 12,8 % y porcentajes de especies básicas entre 27,9 % y 29,0 % (**Tabla 34**). Las formulaciones con sal tienen porcentajes de pico principal ligeramente más altos, en comparación con las formulaciones sin sal. La adición de 0,02 % de PS-80 tuvo poco o ningún beneficio en

términos de heterogeneidad de carga.

Tabla 34

Formulación	Amortiguador	Excipiente 1	Excipiente 2	PS-80 % (/v)	Punto temporal	Condición	Especies ácidas promedia (%)	Pico principal promedio (%)	Especies básicas promedio (%)			
F1	Fosfato 20mM Na	Trehalosa 175mM	----	----	T0	N/A	7.48	64.11	28.42			
F2			3 p		5°C¹	12.76	59.30	27.94				
					40°C	26.84	38.04	35.11				
					T0	N/A	6.31	65.51	28.17			
F3			3 p		5°C¹	9.71	61.27	29.02				
					40°C	26.84	38.04	35.11				
F4	Fosfato 50mM Na		NaCl 100mM	----	T0	N/A	6.06	65.86	28.08			
F5			3P		40°C	23.26	40.61	36.13				
					T0	N/A	6.33	65.68	27.99			
					3p	40°C	22.46	41.38	36.16			
F6			T0		N/A	5.85	66.42	27.72				
					3p	40°C	25.87	40.32	33.81			
F7	Fosfato 20mM Na		NaCl 100mM	----	T0	N/A	5.99	66.32	27.69			
F8			3P		40°C	24.02	41.99	33.99				
					T0	N/A	6.42	65.37	28.21			
					3P	40°C	24.47	42.27	33.26			
F9			T0		N/A	6.11	65.42	28.48				
					3P	40°C	31.97	35.03	33.00			
			T0		N/A	6.13	65.21	28.66				
					3P	40°C	25.40	39.03	35.56			

¹No se analizaron las muestras hasta siete semanas después de la iniciación del estudio.

[0177] Los resultados de SEC-HPLC en el momento inicial mostraron perfiles similares con porcentajes de pico principal entre 98,0 % y 98,2 % y porcentajes de pico de HMW entre 1,9 % y 2,0 %. Después de tres semanas a 40 °C, las muestras mostraron una ligera degradación de la pureza debido a la aparición de un pico de LMW. Los principales porcentajes de pico para las muestras estresadas de tres semanas estuvieron entre 94,8 % y 95,4 %, con porcentajes de pico de HMW entre 1,9 % y 2,1 % y porcentajes de pico de LMW entre 2,7 % y 3,1 %. Después de tres semanas a 5 °C no se observaron cambios significativos en los porcentajes del pico principal y del pico de HMW (**Tabla 35**). Las especies de alto y bajo peso molecular se minimizan con la adición de sal y no se observó ningún beneficio cuando la formulación se complementó con 0,02 % de PS-80.

Tabla 35

Formulación	Amortiguador	Excipiente 1	Excipiente 2	PS-80 % (w/v)	Punto temporal	Condición	Pico HMW (%)	Pico principal (%)	Pico LMW (%)				
F1	Fosfato 20mM Na	Trehalosa 175mM	----	----	T0	N/A	1.85	98.15	---				
F2			3P		5°C	1.85	98.15	---					
					40°C	2.11	94.79	3.10					
F3			3P		T0	N/A	1.87	98.13	---				
					5°C	1.84	98.16	---					
F4					40°C	1.86	95.28	2.86					
Fosfato 50mM Na			NaCl 100mM	T0	N/A	1.90	98.10	---					
			F5			3P		40°C	1.85	95.19	2.96		
								T0	N/A	1.98	98.02	---	
			F6					3P	40°C	2.02	95.15	2.83	
			Fosfato 20mM Na			NaCl 50mM	T0	N/A	1.97	98.03	---		
						F7			3P		40°C	1.98	95.28
T0	N/A										1.95	98.05	---
F8						3P	40°C	1.92	95.40	2.68			
Fosfato 20mM Na			----	0.02	T0	N/A	1.93	98.07	---				
			F9			3P		40°C	2.13	94.82	3.06		
								T0	N/A	1.93	98.07	---	
			F10					3P	40°C	1.90	95.14	2.96	
Fosfato 20mM Na			NaCl 100mM	0.02	T0	N/A	1.87	98.13	---				
			F11			3P		40°C	1.89	95.19	2.91		

Ejemplo 5: Comparación entre crisantaspasa recombinante derivada de *Pseudomonas* (RC-P) y Erwinasa

[0178] Se realizaron experimentos para comparar los atributos de calidad relevantes de la crisantaspasa recombinante derivada de *Pseudomonas* (RC-P) y Erwinase. En la **Tabla 36** se presenta un resumen de los datos y resultados, mediante la comparación de RC-P con Erwinase para demostrar la comparabilidad. Los resultados demuestran que RC-P y Erwinase son comparables en sus estructuras y actividades enzimáticas. Se observaron diferencias de tamaño y carga.

Tabla 36: Resumen de resultados de comparabilidad

Atributo	Método	RC-P	Erwinasa	Resultados
Estructura primaria	Mapa de péptidos LC-MS	Confirma la secuencia de aminoácidos primaria esperada, con PTM muy consistentes		Comparable, con glicación observada en lisina para Erwinasa
Tamaño	Masa intacta (desnaturalizada)	Confirma el peso molecular esperado del monómero.		Medición de peso molecular de monómero comparable, glicación observada en Erwinasa
	SE-HPLC	HMW: 0,2 % Principal: 99,6 % LMW: 0,1 %	HMW: 7,3 % Principal: 92,3 % LMW:	Perfiles comparables y contenidos principales; Erwinasa tiene mayor contenido de HMW

			0,3 %	
	SEC-MALLS	Tetrámero: 99,6 %	Tetrámero: 93,3 %	Perfiles comparables y domina el tetrámero, Erwinasa tiene mayor contenido de octámero
	SEC-MS (Nativo)	Tetrámero: 99,7 %	Tetrámero (con glicación) 92,7 %	Perfiles comparables y tetrámero dominante, Erwinasa tiene glicación y mayor nivel de octámeros
Carga	CIEX (CIEX-MS)	Ácido: 11 % Principal: 84 % Básico: 5 %	Ácido: 18 % Principal: 75 % Básico: 7 %	Perfiles comparables Erwinase tiene variantes más ácidas
	iCIEF	pl de principal: 8,6 Ácido: 15 % Principal: 74 % Básico: 11 %	pl de principal: 8,6 Ácido: 46 % Principal: 45 % Básico: 8 %	El pico principal comparable pl Erwinasa tiene variantes ácidas más altas
Hidrofobicidad	RP-UHPLC (RP- UHPLC-MS)	Pre pico: 14,1 % Principal: 83,2 % Post pico: 2,7 %	Pre pico: 17,2 % Principal: 81,2 % Post pico: 1,5 %	Perfiles comparables y contenidos principales
	HIC	Principal: 98 % Menor 2 %	Principal: 94 % Menor 2 % Pico de elución tardía: 4 %	Perfiles de HIC comparables y contenidos principales. Erwinasa tiene un pico de elución tardía que se correlaciona con las especies de HMW.
Estructura de	HDX MS	Mapas de absorción de		Estructuras de orden

orden superior		deuterio muy consistentes para RC-P y Erwinasa		superior comparables
Potencia	Ensayo de actividad de Nessler	685 U/mg	572 U/mg	Comparable

[0179] Los datos de MS de mapeo de péptidos se extrajeron en busca de péptidos que contenían modificaciones comunes o conocidas, incluidas oxidación, desamidación, succinimida, isomerización, glicación, metilación y acetilación. El alcance relativo de cada modificación se calculó mediante el uso de recuentos de péptidos modificados normalizados frente a péptidos totales, modificados y no modificados. El nivel relativo informado en la presente fue semicuantitativo. No se encontraron modificaciones de metilación y acetilación en ninguno de los materiales. Se encontraron oxidación, desamidación y succinimida tanto en RC-P como en Erwinasa. Sus niveles eran comparables y relativamente bajos como se muestra en la **Tabla 37** (Nota: No se reportan PTM menores de 0,5 %). Además, se observaron niveles bajos de glicación en múltiples posiciones de lisina únicamente en Erwinasa. Modificaciones adicionales de glicación en Erwinase afectarían sus propiedades de carga, lo que resultaría en un aumento de sus variantes ácidas. En general, tanto RC-P como Erwinasa han confirmado la estructura de aminoácidos primarios. Sus PTM son comparables, excepto la modificación de glicación adicional observada en Erwinasa.

Tabla 37: Modificaciones posteriores a la traducción observadas

Modificación posterior a la traducción	RC-P	Erwinasa
% de desamidación (N281)	2,0	2,3
% de oxidación (M133)	0,5	0,7
% de succinimida (N281)	3,9	4,2
% de glicación (K3 o K53)	ND	2,0
% de glicación (K219)	ND	0,8
% de glicación (K269)	ND	2,4
% de glicación (K318)	ND	1,7

[0180] La cromatografía de exclusión por tamaño (SE-UHPLC) proporciona información cuantitativa sobre la distribución del tamaño molecular de una proteína nativa. Los perfiles SE-UHPLC para RC-P y Erwinasa mostraron una distribución

relativa del área de los picos de exclusión por tamaño como se enumera en la **Tabla 38**. Tanto RC-P como Erwinasa tuvieron un contenido de pico principal dominante. La cantidad de especies de alto peso molecular (HMW) observadas para Erwinasa (7,3 %) fue mayor que para RC-P (0,2 %). La cantidad de especies de bajo peso molecular (LMW) observadas tanto para RC-P (0,1 %) como para Erwinasa (0,3 %) fue comparable.

Tabla 38: Porcentaje de HMW, pico principal y LMW del análisis SE-UHPLC

ID de la muestra/ % del área	HMW2	HMW1	Pico principal	LMW
RC-P	ND	0,2	99,6	0,1
Erwinasa	1,9	5,4	92,3	0,3

[0181] Cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz láser de múltiples ángulos: Se realizaron SE-HPLC_MALLS tanto para RC-P como para Erwinasa. La identificación de los picos de exclusión por tamaño se enumeró en la **Tabla 39**. La separación por SE HPLC combinada con MALLS realizada tanto en RC-P como en Erwinasa identificó el contenido principal de SEC como tetrámero, con un peso molecular en el rango de 133-134 kDa. Ambos materiales mostraron contenido de tetrámero dominante. La especie HMW1 para ambos materiales se identificó como el octámero con un PM en el rango de 277-286 kDa, que estaba cerca de la masa teórica del octámero de 280 kDa. La especie HMW2 observada solo para Erwinasa se identificó como el hexadecámero (16 unidades) con un PM de 554 kDa, que coincidía con la masa teórica del hexadecámero de 560 kDa. MALLS no pudo evaluar con precisión el tamaño de las especies de LMW debido a la muy baja abundancia de estas formas tanto en RC-P como en Erwinasa. Los resultados de SEC-MALLS mostraron que tanto RC-P como Erwinasa contenían una forma de tetrámero dominante, sus formas HMW eran similares, identificadas como octámeros. Además, Erwinasa contenía un nivel bajo de 16-mer.

Tabla 39: Resultados de SEC-MALLS

Pico/muestra/ID	RC-P		Erwinasa	
	MW medidos Da	Identidad	Medida MW Da	Identidad
HMW2	NA	ND	554,1	Hexadecámero (16 unidades)
HMW1	277,5	Octámero	286,1	Octámero
Principal	133,2	Tetrámero	133,9	Tetrámero

LMW	NA	NA	NA	NA
-----	----	----	----	----

[0182] Enfoque isoeléctrico capilar con imágenes (iCIEF): iCIEF es un ensayo ortogonal para proporcionar una medición cuantitativa de la heterogeneidad de carga de la proteína RC-P. Los perfiles iCIEF para RC-P y Erwinasa, las áreas de pico relativas para el pico principal, el grupo ácido y el grupo básico con respecto al área total se enumeraron en la **Tabla 40**. Ambos materiales mostraron valores de pI altamente comparables para el contenido principal. Erwinasa tuvo un mayor contenido de variantes ácidas.

Tabla 40: Distribución de variantes de carga de iCIEF para RC-P y Erwinasa

Nombre de muestra	pI	Porcentaje (%)		
	Pico principal	Variantes ácidas	Pico principal	Variantes básicas
RC-P	8,6	15	74	11
Erwinasa	8,6	46	45	8

Nota: Es posible que el porcentaje total no sume exactamente 100 % debido al redondeo.

Estudio de oxidación:

[0183] Tanto las muestras de RC-P como de Erwinasa se sometieron a oxidación forzada mediante tratamiento con 0,01 % (v/v) de H₂O₂ durante 4 h a temperatura ambiente, respectivamente. Los resultados de las pruebas analíticas mostraron que las muestras oxidadas de RC-P y Erwinasa tenían alrededor de 30 % de oxidación de residuos de metionina en total, alrededor de 20 % de aumento en los contenidos previos al pico de RP-UHPLC, un aumento en las variantes ácidas de iCIEF, un ligero aumento en contenido de HMW de SEC y tenía propiedades de actividad CIEF, HIC comparables. Los resultados analíticos detallados se analizan a continuación.

[0184] Resultados del mapeo de péptidos: Se emplearon métodos LC-MS de mapeo de péptidos tripticos para confirmar la estructura primaria de la proteína e identificar posibles modificaciones postraduccionales inducidas por condiciones de oxidación forzada, especialmente oxidaciones de metionina. Los resultados del mapeo de péptidos mostraron que la RC-P y la Erwinasa oxidadas forzadamente tenían la estructura primaria esperada con oxidación de metionina en múltiples ubicaciones (**Tabla 41**). Las superposiciones de los perfiles de mapeo de péptidos de RC-P y Erwinasa tratados con H₂O₂ son comparables. Ambas trazas de muestra oxidadas mostraron un aumento en la intensidad de pico del péptido oxidado que contiene M133, M60 y M121 respectivamente. El RC-P y Erwinase tratados con H₂O₂

mostraron diferentes niveles de oxidación en múltiples ubicaciones de metionina (**Tabla 41**). Las localizaciones de metionina propensas a la oxidación de más a menos susceptibles fueron: M133 (~20 %) > M60 (~8 %) > M121(~4 %) > M308 (~1 %). Se observó alrededor del 33 % de oxidación total de metionina en ambas muestras. Se observaron niveles similares de intermedios de desamidación y succinimida en Asn281 tanto para las muestras oxidadas como para el estándar de referencia.

Tabla 41: PTM para RC-P oxidado y Erwinasa

Modificación posterior a la traducción	RC-P RS	RC-P Oxidado	Erwinasa Oxidada
% de desamidación (N281)	2,8	2,8	3,3
% de oxidación (M133)	0,5	19,5	18,5
% de oxidación (M60)	0,9	8,1	7,7
% de oxidación (M121)	0,7	4,3	4,2
% de oxidación (M308)	0,6	1,2	1,1
% de succinimida (N281)	4,5	4,6	4,5
% de glicación (K3/K30/K53)	ND	ND	3,4
% de glicación (K265/K269)	ND	ND	2,3
% de glicación (K318)	ND	ND	1,4

[0185] Resultados de SE-UHPLC: Se utilizó el método SE-UHPLC para evaluar la distribución de tamaños de RC-P en su estado nativo en condiciones no desnaturalizantes. Se analizaron las superposiciones del RC-P oxidado, la Erwinasa oxidada y el estándar de referencia. No se observaron diferencias significativas en el perfil entre las muestras oxidadas y el RS. Ambas muestras oxidadas mostraron predominantemente un pico de tetrámero, un ligero aumento en los contenidos de HMW y contenidos de LMW comparables, en comparación con el estándar de referencia. Las intensidades relativas de los picos se enumeran en la **Tabla 42**.

Tabla 42: Resultados de SE-UHPLC

ID de la muestra/ % del área	HMW1/HMW2	Pico principal	LMW
RC-P RS (RM-M-0009)	0,2	99,6	0,1
Erwinasa	7,3	92,3	0,3

Erwinasa Oxidada	11,7	88,2	0,1
RC-P (GMP4) Oxidado	1,2	98,7	0,1

[0186] Resultados de CIEX: Se utilizó el método CIEX para evaluar la distribución de carga de RC-P en su estado nativo en condiciones no desnaturalizantes. Se analizaron las superposiciones del RC-P oxidado, la Erwinasa oxidada y el estándar de referencia. No se observaron cambios significativos en el perfil entre las muestras oxidadas y el estándar de referencia. Ambas muestras oxidadas mostraron un contenido de pico predominantemente principal. Las intensidades relativas de los picos de las muestras estresadas y del patrón de referencia se enumeran en la **Tabla 43**.

Tabla 43: Resultados de CIEX

ID de la muestra/ % del área	% ácido	% principal	% básico
RC-P RS (RM-M-0009)	11	85	4
Erwinasa	18	75	7
Oxidación de erwinasa estresada	19	72	9
Oxidación de RC-P (GMP4) estresada	12	85	3

[0187] Resultados de iCIEF: El método iCIEF es un método ortogonal para evaluar la distribución de carga de RC-P con un campo eléctrico aplicado. Se analizaron las superposiciones de la muestra oxidada y el estándar de referencia. Sus intensidades relativas de los picos se enumeran en la **Tabla 44**. Ambas muestras oxidadas mostraron un pico ácido aumentado en pl alrededor de 8,5. La oxidación no tiene ningún impacto para las variantes básicas.

Tabla 44: Resultados iCIEF para la muestra oxidada y RS

ID de la muestra/ % del área	% ácido	% principal	% básico
RC-P RS (RM-M-0009)	14	73	12

Erwinasa	46	45	8
Oxidación de erwinasa estresada	54	35	11
Oxidación de GMP4 estresada	41	46	14

Estudio de pH bajo:

[0188] Tanto las muestras de RC-P como de Erwinase se sometieron a un tratamiento de pH bajo con fosfato de sodio 50 mM a pH 3,4 a temperatura ambiente y luego se congelaron a -80°C. El estudio previo demostró que el tiempo de incubación a pH 3,4 no era crítico; desde 15 minutos hasta 7 días, los perfiles SE-UHPLC de las muestras tratadas eran comparables. Las muestras tratadas se mantuvieron relativamente estables almacenadas a -80 °C hasta 8 semanas. Los resultados de las pruebas analíticas mostraron que las muestras tratadas de RC-P y Erwinasa tenían alrededor de un 10 % de contenido de monómero con actividades reducidas. Sus perfiles de mapeo de péptidos, propiedades PTM, CIEX, RP-UHPLC y HIC fueron comparables a los de los no tratados. Los resultados analíticos detallados se analizan a continuación.

[0189] Resultados de SE-UHPLC: Se utiliza el método SE-UHPLC para evaluar la distribución de tamaños de RC-P en su estado nativo en condiciones no desnaturalizantes. Se analizaron las superposiciones del RC-P tratado con pH bajo, Erwinasa y el estándar de referencia. Tanto RC-P tratado con pH bajo como Erwinasa mostraron predominantemente un pico de tetrámero y un aumento de alrededor de 10 % en los contenidos de LMW, en comparación con el estándar de referencia. El tratamiento con pH bajo provocó un ligero aumento del contenido de HMW para Erwinasa de 7,3 % a 10,6 %, mientras que no hubo impacto para RC-P. Sus intensidades relativas de los picos se enumeran en la **Tabla 45**.

Tabla 45: Resultados de SE-UHPLC

ID de la muestra/ % del área	HMW1/HMW2	Pico principal	LMW
RC-P RS (RM-M-0009)	0,2	99,6	0,1
Erwinasa	7,3	92,3	0,3
Erwinasa tratada con pH bajo	10,6	79,9	9,5
RC-P (GMP4) tratado con pH bajo	0,2	87,4	12,4

[0190] Resultados de CIEX: Se utiliza el método CIEX para evaluar la distribución de carga de RC-P en su estado nativo en condiciones no desnaturalizantes. Se analizaron las superposiciones del RC-P tratado con pH bajo, Erwinasa y el estándar de referencia. No se observaron cambios significativos en el perfil entre las muestras tratadas con pH y el estándar de referencia. Ambas muestras tratadas mostraron un contenido de pico predominantemente principal. Las intensidades relativas de los picos de las muestras tratadas y del patrón de referencia se enumeran en la **Tabla 46**.

Tabla 46: Resultados de CIEX

ID de la muestra/ % del área	% ácido	% principal	% básico
RC-P RS (RM-M-0009)	11	85	4
Erwinasa	18	75	7
Erwinasa tratada con pH bajo	15	78	7
RC-P (GMP4) tratado con pH bajo	11	85	4

[0191] Resultados de iCIEF: El método iCIEF es un método ortogonal para evaluar la distribución de carga de RC-P con un campo eléctrico aplicado. Se analizaron las superposiciones del RC-P tratado con pH bajo, Erwinasa y el estándar de referencia. Sus intensidades relativas de los picos se enumeran en la **Tabla 47**. Tanto RC-P tratado con pH bajo como Erwinase mostraron un pico ácido aumentado en pl alrededor de 7,2, que se identificó previamente como monómero. El tratamiento con

pH bajo no tuvo impacto para las variantes básicas.

Tabla 47: Resultados iCIEF para la muestra oxidada y RS

ID de la muestra/ % del área	% ácido	% principal	% básico
RC-P RS (RM-M-0009)	14	73	12
Erwinasa	46	45	8
Erwinasa tratada con pH bajo	48	38	13
RC-P (GMP4) tratado con pH bajo	26	59	15

[0192] La comparabilidad de RC-P y Erwinasa se evaluó al comparar sus características fisicoquímicas, de pureza, estructurales y de potencia. La heterogeneidad basada en el tamaño, analizada por SE-UHPLC, SEC-MALLS y SEC-MS, es comparable. Ambos materiales tienen una estructura tetramérica dominante. La especie HMW fue identificada como un octámero. Erwinasa tiene niveles más altos de octámero. También se observaron niveles bajos de especies de 16 unidades en Erwinasa (<2 %). Anteriormente se ha demostrado mediante la caracterización de variantes de tamaño de RC-P que el octámero muestra una actividad comparable a la del tetramero. En general, las diferencias observadas en la distribución del tamaño entre Erwinasa y RC-P tienen un impacto mínimo en la eficacia del fármaco. Erwinasa tiene modificaciones de glicación, que contribuyen a las diferencias entre las variantes ácidas. El mayor nivel de octámero/16-mero observado en Erwinasa contribuyó a las variantes básicas de elución tardía mostradas en CIE. Un estudio previo de degradación forzada de RC-P demuestra que el RC-P glicado tiene una estructura y actividad comparables a las del RC-P. Los perfiles hidrofóbicos, medidos por HIC y RP-UHPLC, son comparables para ambos materiales. Se observaron diferencias menores que se deben a la modificación de la glicación y al mayor nivel de contenido de HMW de Erwinasa. La estructura primaria y la estructura de orden superior de ambos materiales son comparables. Los resultados de potencia son comparables. El estudio de degradación forzada indica que Erwinasa y RC-P tienen una estabilidad comparable bajo estrés oxidado y de pH bajo. Tanto RC-P oxidado como Erwinasa con un aumento de alrededor de 20 % en el pico previo de RP-UHPLC tienen una actividad comparable en comparación con sus materiales no tratados. Tanto RC-P

como Erwinase tratados en condiciones de estrés de pH bajo tienen una actividad reducida, lo que se correlaciona muy bien con los contenidos de monómero de las muestras tratadas. En función de estos datos, RC-P demuestra una estructura, propiedades biológicas y funciones comparables a las de Erwinasa.

FORMAS DE REALIZACIÓN ENUMERADAS

[0193] Las siguientes formas de realización enumeradas son representativas de algunos aspectos de la invención.

[0194] Forma de realización 1: Una formulación acuosa no liofilizada, que comprende:

(i) una L-asparaginasa, en donde la L-asparaginasa comprende cuatro unidades monoméricas, en donde cada unidad monomérica tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 % idéntica a SEQ ID NO: 1;

(ii) uno o más disacáridos, en donde el uno o más disacáridos comprenden trehalosa, sacarosa o cualquier combinación de estas; y

(iii) uno o más amortiguadores, en donde el uno o más amortiguadores están sustancialmente libres de aminoácidos,

en donde la formulación comprende menos de alrededor de 5 % de especies de bajo peso molecular (LMW) después del almacenamiento a 37 °C durante una semana.

[0195] Forma de realización 2: La formulación de acuerdo con la forma de realización 1, en donde la L-asparaginasa está presente a una concentración de alrededor de 20 mg/ml.

[0196] Forma de realización 3: La formulación de acuerdo con la forma de realización 1 o la forma de realización 2, en donde la L-asparaginasa no está PEGilada ni PASilada.

[0197] Forma de realización 4: La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-3, en donde el uno o más disacáridos comprenden trehalosa.

[0198] Forma de realización 5: La formulación de acuerdo con la forma de realización 4, en donde la trehalosa está presente en una concentración de entre alrededor de 50 mM y alrededor de 300 mM.

[0199] Forma de realización 6: La formulación de acuerdo con la forma de realización 4, en donde la trehalosa está presente en una concentración de entre alrededor de 150 mM y alrededor de 275 mM.

[0200] Forma de realización 7: La formulación de acuerdo con la forma de realización 4, en donde la trehalosa está presente en una concentración de alrededor de 170 mM.

[0201] Forma de realización 8: La formulación de acuerdo con cualquiera de las

formas de realización 1-7, en donde el uno o más amortiguadores comprenden un amortiguador de fosfato, un amortiguador de acetato o cualquier combinación de estos.

[0202] Forma de realización 9: La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-7, en donde el uno o más amortiguadores comprenden un amortiguador de fosfato.

[0203] Forma de realización 10: La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-7, en donde el uno o más amortiguadores comprenden fosfato de sodio.

[0204] Forma de realización 11: La formulación de acuerdo con la forma de realización 10, en donde el fosfato de sodio está presente en una concentración de entre alrededor de 0,5 mM y alrededor de 50 mM.

[0205] Forma de realización 12: La formulación de acuerdo con la forma de realización 10, en donde el fosfato de sodio está presente en una concentración de alrededor de 20 mM.

[0206] Forma de realización 13: La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-12, en donde la formulación comprende además cloruro de sodio.

[0207] Forma de realización 14: La formulación de acuerdo con la forma de realización 13, en donde el cloruro de sodio está presente en una concentración de entre alrededor de 25 mM y alrededor de 150 mM.

[0208] Forma de realización 15: La formulación de acuerdo con la forma de realización 13, en donde el cloruro de sodio está presente en una concentración de alrededor de 50 mM.

[0209] Forma de realización 16: La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-15, en donde la formulación comprende además uno o más excipientes.

[0210] Forma de realización 17: La formulación de acuerdo con la forma de realización 16, en donde el uno o más excipientes comprenden polisorbato 80.

[0211] Forma de realización 18: La formulación de acuerdo con la forma de realización 17, en donde el polisorbato 80 está presente en una concentración de entre alrededor de 0,004 % (p/v) y alrededor de 0,2 % (p/v).

[0212] Forma de realización 19: La formulación de acuerdo con la forma de realización 17, en donde el polisorbato 80 está presente en una concentración de alrededor de 0,02 % (p/v).

[0213] Forma de realización 20: La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-19, en donde la formulación tiene un pH de entre alrededor de 4,0 y alrededor de 8,5.

[0214] Forma de realización 21: La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-19, en donde la formulación tiene un pH de alrededor de 7,0.

[0215] Forma de realización 22: Un método para tratar una enfermedad, afección o trastorno que se puede tratar mediante la reducción de asparagina en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una formulación de cualquiera de las formas de realización 1-21.

[0216] Forma de realización 23: El método de acuerdo con la forma de realización 22, en donde la enfermedad, afección o trastorno es cáncer.

[0217] Forma de realización 24: El método de acuerdo con la forma de realización 23, en donde el tipo de cáncer es leucemia linfoblástica aguda (ALL).

[0218] Forma de realización 25: El método de acuerdo con la forma de realización 24, en donde la ALL es ALL recidivante.

[0219] Forma de realización 26: El método de acuerdo con la forma de realización 23, en donde el tipo de cáncer es linfoma linfoblástico (LBL).

[0220] Forma de realización 27: El método de acuerdo con la forma de realización 26, en donde el LBL es LBL recidivante.

[0221] Forma de realización 28: El método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 22-27, en donde la formulación se administra intramuscularmente.

[0222] Forma de realización 29: El método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 22-27, en donde la formulación se administra por vía intravenosa.

[0223] Forma de realización 30: El método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 22-29, en donde la formulación se coadministra con uno o más agentes quimioterapéuticos diferentes.

[0224] Forma de realización 31: Un kit que comprende: (i) una formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-21; e (ii) instrucciones para tratar una enfermedad, afección o trastorno que se puede tratar mediante la reducción de asparagina en un sujeto que lo necesite.

[0225] Forma de realización 32: El kit de acuerdo con la forma de realización 31, en donde la enfermedad, afección o trastorno es cáncer.

[0226] Forma de realización 33: El kit de acuerdo con la forma de realización 32, en donde el tipo de cáncer es leucemia linfoblástica aguda (ALL).

[0227] Forma de realización 34: El kit de acuerdo con la forma de realización 33, en

donde la ALL es ALL recidivante.

[0228] Forma de realización 35: El kit de acuerdo con la forma de realización 32, en donde el tipo de cáncer es linfoma linfoblástico (LBL).

[0229] Forma de realización 36: El kit de acuerdo con la forma de realización 35, en donde el LBL es LBL recidivante.