

Titolo: FORMULAZIONI STABILI DI DOMINI
IMMUNOGLOBULINICI SINGOLI VARIABILI E LORO USI

DESCRIZIONE

Campo tecnico

Descrizione

1. Campo dell'invenzione

[0001] La presente invenzione si riferisce a formulazioni stabili di polipeptidi, per esempio domini immunoglobulinici singoli variabili, in particolare domini immunoglobulinici singoli variabili diretti contro il fattore di von Willebrand (vWF, von Willebrand factor), comprendenti la SEQ ID NO: 1, ossia il Nanobody ALX-0081.

[0002] L'invenzione fornisce formulazioni che sono stabili alla conservazione per periodi di tempo prolungati e in un ampio intervallo di temperature. Le formulazioni dell'invenzione assicurano un'alta stabilità del polipeptide, consentendo cicli di congelamento/scongelo multipli senza deterioramento chimico o fisico, e forniscono stabilità in relazione a stress meccanico, come stress da agitazione, sforzo di taglio o mescolamento. Sono idonee per preparazioni farmaceutiche e diagnostiche e compatibili con diluenti farmaceuticamente accettabili,

come soluzione salina, soluzione di Ringer o soluzione di glucosio/destrosio.

[0003] La presente invenzione si riferisce anche a metodi di preparazione, metodi per la conservazione e a usi delle formulazioni. L'invenzione inoltre si riferisce a forme di dosaggio unitario, kit e usi medici delle formulazioni.

2. Tecnica nota

[0004] I domini immunoglobulinici singoli variabili, come i domini VHH di camelidi, i domini VH camelizzati o i domini VHH umanizzati, rappresentano una classe in rapida crescita di sostanze terapeutiche anticorpali. Per esempio, in WO2004/015425, WO2004/062551, WO2006/074947, WO2006/122825, WO2009/115614 e WO2011/067160 sono stati descritti domini immunoglobulinici singoli variabili contro il vWF.

[0005] Le proteine come i domini immunoglobulinici singoli variabili (ISVD, immunoglobulin single variable domain) tipicamente devono essere conservate e trasportate tra la fabbricazione iniziale e l'uso, per esempio la somministrazione a un paziente. I processi di trasporto, fabbricazione, conservazione ed erogazione possono esercitare stress molteplici sul dominio immunoglobulinico singolo variabile, come

stress chimici e fisici. Durante la conservazione possono verificarsi modifiche chimiche come, per esempio, deammidazione, racemizzazione, idrolisi, ossidazione, isomerizzazione, beta-eliminazione o scambio disolfuro. Gli stress fisici possono causare denaturazione e dispiegamento, aggregazione, formazione di particolato, precipitazione, opalescenza o adsorbimento.

[0006] Permane una necessità di fornire formulazioni per domini immunoglobulinici singoli variabili, per esempio come definiti nel presente documento, che migliorino la stabilità, preservino l'agente attivo dallo stress chimico e/o meccanico e quindi consentano la conservazione e cambiamenti di temperatura senza deterioramento fisico o chimico significativo, rimangano stabili per periodi di tempo prolungati e/o siano di facile uso per il paziente, per esempio in cui l'agente attivo è solubile ad alta concentrazione.

3. Sommario dell'invenzione

[0007] È noto che gli stress summenzionati possono influire sull'integrità fisicochimica delle sostanze terapeutiche proteiche, per esempio delle sostanze terapeutiche anticorpali. Per esempio, aggregazione, deammidazione e ossidazione sono state descritte come

le cause più comuni di degradazione degli anticorpi (Cleland et al., 1993, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems 10, 307-377). Allo stesso tempo è fondamentale che siano fornite formulazioni che preservino l'integrità chimica e fisica dei domini immunoglobulinici singoli variabili. L'integrità chimica e fisica è necessaria per l'uso per esempio come un agente terapeutico e tipicamente è anche associata ad attività biologica. Sebbene la nostra conoscenza della stabilità delle proteine stia aumentando, ottimizzare le condizioni di formulazione per sopprimere completamente o minimizzare questi molteplici stress e assicurare una durata di vita prolungata rimane una sfida importante.

[0008] Si sa poco in merito a formulazioni idonee di domini immunoglobulinici singoli variabili. WO2010/077422 descrive una formulazione di un Nanobody legante il TNF comprendente un lioprotettore, un tensioattivo e un tampone scelto tra tampone di istidina e tampone di Tris-HCl a un pH da 5,0 a 7,5.

[0009] Leganti del vWF specifici, e in particolare domini immunoglobulinici singoli variabili con elevata affinità per il vWF come ALX-0081 [INN: caplacizumab], sono stati testati come terapia adiuvante per pazienti

con sindrome coronarica acuta (ACS, acute coronary syndrome) sottoposti a intervento coronarico percutaneo (PCI, percutaneous coronary intervention) e vengono sviluppati come trattamento della porpora trombotica trombocitopenica (TTP, thrombotic thrombocytopenic purpura). Sono state completate con successo sperimentazioni cliniche di fase I e attualmente sono in corso test in sperimentazioni di Fase II. Finora, ALX-0081 è stato presentato sotto forma di una formulazione liquida a base di fosfato contenente 5 mg/ml dell'ingrediente farmaceutico attivo (API, active pharmaceutical ingredient) in D-PBS, glicina 200 mM e Tween-80 allo 0,02% (v/v). Callewaert et al. (2012 Blood 17:3603-3610) trattano la valutazione dell'efficacia e sicurezza del Nanobody anti-vWF ALX-0681 (caplacizumab) in un modello preclinico di babbuino di aTTP. Callewaert et al. descrivono inoltre che caplacizumab è formulato in un tampone di PBS.

[0010] Sebbene abbia dimostrato di essere efficace, questa formulazione potrebbe essere migliorata in diversi modi. Innanzitutto, l'attuale concentrazione probabilmente richiederebbe iniezioni sottocutanee multiple (ipotizzando che il volume per iniezione sottocutanea sia limitato a circa 1 ml), riducendo in

tal modo la facilità d'uso e la convenienza per il paziente. Secondariamente, la stabilità alla conservazione e la durata di vita dell'attuale formulazione di ALX-0081 (qui di seguito denominata anche ALX-0081 contemporaneo) possono essere migliorate a temperature elevate. La stabilità nella presente formulazione ad alte temperature viene determinata principalmente in base a modifiche chimiche sul polipeptide. Le modifiche chimiche possono essere collegate a perdita di potenza.

[0011] Sebbene si possa ottenere una durata di vita praticabile conservando il prodotto a -20°C , ciò non è tuttavia considerato essere un'opzione favorevole per la maggior parte degli scopi pratici.

[0012] La crioessiccazione è una tecnica comunemente impiegata per preservare le proteine che serve per rimuovere acqua dalla preparazione proteica di interesse. La crioessiccazione, o liofilizzazione, è un processo mediante il quale il materiale da essiccare viene prima congelato e quindi il ghiaccio o il solvente congelato viene rimosso mediante sublimazione in un ambiente sotto vuoto. Nelle formulazioni prelioofilizzate può essere incluso un eccipiente per migliorare la stabilità durante il processo di

crioessiccazione e/o per migliorare la stabilità del prodotto liofilizzato alla conservazione (Arakawa et al. Pharm. Res. 8(3):285-291 (1991)).

[0013] La presente invenzione fornisce quanto segue:

[1] Una formulazione comprendente un legante del fattore di von Willebrand (vWF), un tampone citrato, saccarosio e Tween-80, in cui:

(a) il legante del vWF ha una concentrazione da 10 mg/ml a 40 mg/ml;

(b) il saccarosio ha una concentrazione del 7% (p/v);

(c) Tween-80 ha una concentrazione dello 0,01% (v/v); e

(d) il tampone citrato ha una concentrazione di 20 mM in modo che il pH della formulazione sia 6,5, e

in cui detto legante del vWF comprende la SEQ ID NO: 1.

[2] La formulazione secondo [1], in cui detto legante del vWF è la SEQ ID NO: 1.

[3] La formulazione secondo [1] o [2], in cui

(a) il legante del vWF ha una concentrazione da 10 mg/ml a 12,5 mg/ml.

[4] La formulazione secondo uno qualsiasi di da [1] a [3], in cui

(a) il legante del vWF ha una concentrazione di 10 mg/ml o 12,5 mg/ml.

[5] La formulazione secondo uno qualsiasi di da [1] a

[4], che ha:

- (i) meno del 5% di specie ad alto peso molecolare (HMW) dopo conservazione per almeno 12 mesi a 5 °C; e/o
- (ii) meno del 5% di specie a basso peso molecolare (LMW) dopo conservazione per almeno 12 mesi a 5 °C.

[6] La formulazione secondo uno qualsiasi di da [1] a [5], in cui il legante del vWF nella formulazione mantiene almeno circa l'80% della sua stabilità dopo conservazione per almeno 12 mesi a 5 °C.

[7] La formulazione secondo uno qualsiasi di da [1] a [6], in cui almeno l'80%, preferibilmente almeno il 90%, più preferibilmente almeno il 95% o perfino almeno il 99% del legante del vWF mantiene la sua attività di legame dopo la conservazione rispetto all'attività di legame prima della conservazione, detta attività di legame come misurata mediante ELISA e/o Biacore.

[8] La formulazione secondo uno qualsiasi di da [1] a [7], che è una formulazione liquida o liofilizzata ricostituita comprendente:

- (a) un legante del vWF a una concentrazione da 10 mg/ml a 12,5 mg/ml, preferibilmente di 12,5 mg/ml;
- (b) saccarosio a una concentrazione del 7% (p/v);
- (c) Tween-80 a una concentrazione dello 0,01% (v/v); e
- (d) un tampone citrato a una concentrazione di 20 mM,

in modo che il pH della formulazione sia 6,5.

[9] La formulazione secondo uno qualsiasi di da [1] a [7], che è una formulazione per conservazione in massa comprendente:

(a) un legante del vWF a una concentrazione di da 10 mg/ml a 12,5 mg/ml, preferibilmente di 12,5 mg/ml;

(b) saccarosio a una concentrazione del 7% (p/v);

(c) Tween-80 a una concentrazione dello 0,01% (v/v); e

(d) un tampone citrato a una concentrazione di 20 mM,

in modo che il pH della formulazione sia 6,5;

in cui almeno 100 litri della formulazione sono conservati in condizioni al di sotto del punto di congelamento.

[10] La formulazione secondo uno qualsiasi di da [1] a [9], che è in forma liquida, liofilizzata, essiccata a spruzzo, liofilizzata ricostituita o congelata.

[11] Un metodo o processo per preparare una formulazione secondo uno qualsiasi di da [1] a [10], in cui detto metodo o processo comprende le fasi di:

- esprimere il legante del vWF in una coltura cellulare;

- purificare il legante del vWF facendo passare il legante del vWF attraverso almeno una tra una fase di purificazione mediante cromatografia e una fase di

ultrafiltrazione/diafiltrazione;

- regolare la concentrazione del legante del vWF a da 10 a 40 mg/ml, preferibilmente a 12,5 mg/ml, in una formulazione contenente:

- (i) saccarosio a una concentrazione del 7% (p/v);
- (ii) Tween-80 a una concentrazione dello 0,01% (v/v); e
- (iii) un tampone citrato a una concentrazione di 20 mM, in modo che il pH della formulazione sia 6,5.

[12] Un metodo per preparare una formulazione ricostituita secondo uno qualsiasi di da [1] a [10], in cui detto metodo comprende le fasi di: (i) liofilizzare una miscela di un legante del vWF, un lioprotettore, un tensioattivo e un tampone, in tal modo formando una miscela liofilizzata; e (ii) ricostituire la miscela liofilizzata in un diluente, in tal modo preparando la formulazione, in cui la formulazione ricostituita comprende

- (a) un legante del vWF a una concentrazione di da 10 mg/ml a 40 mg/ml, preferibilmente di 12,5 mg/ml;
- (b) saccarosio a una concentrazione del 7% (p/v);
- (c) Tween-80 a una concentrazione dello 0,01% (v/v); e
- (d) un tampone citrato a una concentrazione di 20 mM, in modo che il pH della formulazione sia 6,5.

[13] Un kit o un articolo di fabbricazione,

comprendente un contenitore contenente la formulazione secondo uno qualsiasi di da [1] a [10], e istruzioni per l'uso.

[14] Il kit o l'articolo di fabbricazione secondo [13], in cui la formulazione è presente in un flacone o in una siringa iniettabile.

[0014] La presente descrizione si riferisce a una formulazione comprendente un legante del fattore di von Willebrand (vWF) e un tampone citrato o fosfato, preferibilmente un tampone citrato, con un pH nell'intervallo da 5,0 a 7,5. In particolare, la presente descrizione si riferisce a una formulazione come descritta nel presente documento, in cui detto legante del vWF comprende almeno un dominio immunoglobulinico singolo variabile che si lega alla SEQ ID NO: 20.

[0015] Detto dominio immunoglobulinico singolo variabile comprende o consiste essenzialmente di, ma non è limitato a, un dominio immunoglobulinico singolo variabile che è una sequenza di dominio variabile della catena pesante, più specificatamente un dominio immunoglobulinico singolo variabile che è una sequenza di dominio variabile della catena pesante che deriva da un anticorpo convenzionale a quattro catene o una

sequenza di dominio variabile della catena pesante che deriva da un anticorpo a catena pesante o un Nanobody (inclusa ma non limitata a una sequenza VHH), preferibilmente un Nanobody.

[0016] In aggiunta, la presente descrizione si riferisce a una formulazione come descritta nel presente documento, in cui detto legante del vWF comprende almeno una tra le SEQ ID NO: 1-19. Inoltre, la presente descrizione si riferisce a una formulazione come descritta nel presente documento, in cui detto legante del vWF è un polipeptide a catena singola comprendente uno o più domini immunoglobulinici singoli variabili, preferibilmente in cui detto legante del vWF è monovalente o multivalente, in cui detto legante del vWF è monospecifico o multispecifico e/o in cui uno o più domini immunoglobulinici singoli variabili sono CDR-innestati, umanizzati, camelizzati, deimmunizzati e/o generati *in vitro* (per esempio selezionati mediante esposizione su fago). La presente descrizione si riferisce anche a una formulazione come descritta nel presente documento, in cui detto legante del vWF comprende una sequenza amminoacidica che è identica almeno al 90% alla SEQ ID NO: 1. La presente descrizione si riferisce anche a una formulazione come

descritta nel presente documento, in cui detto legante del vWF ha una concentrazione nell'intervallo da 0,1 a 80 mg/ml e/o in cui detto tampone ha una concentrazione nell'intervallo da 5 a 200 mM.

[0017] In aggiunta, la presente descrizione si riferisce a una formulazione come descritta nel presente documento, comprendente inoltre un eccipiente, preferibilmente detto eccipiente ha una concentrazione nell'intervallo da 10 a 500 mM, più preferibilmente in cui detto eccipiente è selezionato dall'elenco consistente di saccarosio, glicina, mannitolo, trealosio e NaCl, ancora più preferibilmente in cui detto saccarosio ha una concentrazione nell'intervallo dall'1 al 15%, preferibilmente dal 2 al 12%, preferibilmente dal 4 al 10%, per esempio del 4, 5, 6, 7, 8 o 9% (p/v), maggiormente preferibilmente del 7%.

[0018] La presente descrizione si riferisce anche a una formulazione come descritta nel presente documento, in cui il tampone è selezionato tra un tampone citrato, preferibilmente detto tampone citrato ha un pH tra 6,0 e 7,0, più preferibilmente di 6,5; e un tampone fosfato, preferibilmente detto tampone fosfato ha un pH nell'intervallo da 6,5 a 7,5, preferibilmente di 7,1.

[0019] In aggiunta, la presente descrizione si

riferisce a una formulazione come descritta nel presente documento, comprendente inoltre un detergente non ionico, come Tween-80, preferibilmente in una concentrazione tra lo 0,001 e lo 0,5% (v/v), più preferibilmente tra lo 0,01 e lo 0,02% (v/v).

[0020] Inoltre, la presente descrizione si riferisce a una formulazione come descritta nel presente documento, in cui detto tampone è un tampone citrato a pH 6,5 \pm 0,5, per esempio 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7 o 6,8, più specificatamente 6,5, e in cui detta formulazione comprende inoltre saccarosio avente una concentrazione nell'intervallo dall'1 al 15%, preferibilmente dal 2 al 12%, preferibilmente dal 4 al 10%, per esempio del 4, 5, 6, 7, 8 o 9% (p/v), maggiormente preferibilmente del 7%, e preferibilmente comprende inoltre un detergente non ionico come Tween-80, preferibilmente a una concentrazione dello 0,01% (v/v).

[0021] Inoltre, la presente descrizione si riferisce a una formulazione come descritta nel presente documento, in cui detta formulazione ha un'osmolalità nell'intervallo di 290 \pm 60 mOsm/kg, più preferibilmente nell'intervallo di 290 \pm 20 mOsm/kg.

[0022] La presente descrizione si riferisce inoltre a una formulazione comprendente:

(a) un legante del vWF a una concentrazione da circa 0,1 mg/ml a circa 80 mg/ml;

(b) un eccipiente scelto tra saccarosio, glicina, mannitolo, trealosio o NaCl a una concentrazione da circa l'1% a circa il 15% (p/v);

(c) Tween-80 a una concentrazione da circa lo 0,001% allo 0,5% (v/v); e

(d) un tampone scelto tra tampone citrato a una concentrazione da circa 5 mM a circa 200 mM in modo che il pH della formulazione sia da circa 6,0 a 7,0 e un tampone fosfato a una concentrazione da circa 10 mM a circa 50 mM in modo che il pH della formulazione sia da circa 6,5 a 7,5, in cui il legante del vWF nella formulazione mantiene almeno circa l'80% della sua stabilità dopo conservazione per almeno 12 mesi a 5 °C o perfino per 24 mesi a 5 °C.

[0023] La descrizione si riferisce anche a una formulazione che ha meno del 5% di specie ad alto peso molecolare (HMW) dopo conservazione per almeno 12 mesi a 5 °C o perfino per 24 mesi a 5 °C; e/o meno del 5% di specie a basso peso molecolare (LMW) dopo conservazione per almeno 12 mesi a 5 °C o perfino per 24 mesi a 5 °C.

[0024] La descrizione si riferisce inoltre a una formulazione in cui almeno l'80%, preferibilmente

almeno il 90%, più preferibilmente almeno il 95% o perfino almeno il 99% del legante del vWF mantiene la sua attività di legame dopo la conservazione rispetto all'attività di legame prima della conservazione, detta attività di legame come misurata mediante ELISA e/o Biacore.

[0025] In aggiunta, la descrizione si riferisce a una formulazione come descritta nel presente documento, in cui detta formulazione è in una forma liquida, liofilizzata, essiccata a spruzzo, liofilizzata ricostituita o congelata, più specificatamente la descrizione riguarda una formulazione liquida o liofilizzata ricostituita comprendente:

- (a) un legante del vWF a una concentrazione da circa 0,1 mg/ml a circa 80 mg/ml;
- (b) saccarosio a una concentrazione da circa l'1% a circa il 15% (p/v);
- (c) Tween-80 a una concentrazione da circa lo 0,001% allo 0,5% (v/v); e
- (d) un tampone citrato a una concentrazione da circa 5 mM a circa 200 mM, in modo che il pH della formulazione sia da circa 6,0 a 7,0.

[0026] La formulazione liofilizzata può quindi essere ricostituita come necessario miscelando la forma

liofilizzata con un diluente idoneo (per esempio acqua) per risolubilizzare i componenti della formulazione originale a una concentrazione desiderata.

[0027] La presente descrizione si riferisce anche a una formulazione come descritta nel presente documento, in cui detta formulazione è una formulazione per conservazione in massa comprendente:

(a) un legante del vWF a una concentrazione da circa 0,1 mg/ml a circa 80 mg/ml;

(b) saccarosio a una concentrazione da circa l'1% a circa il 15%;

(c) Tween-80 a una concentrazione da circa lo 0,001% allo 0,5% (p/v); e

(d) un tampone citrato a una concentrazione da circa 5 mM a circa 200 mM, in modo che il pH della formulazione sia da circa 6,0 a 7,0, in cui almeno 100 litri della formulazione sono conservati in condizioni al di sotto del punto di congelamento.

[0028] In aggiunta, la presente descrizione si riferisce a una formulazione, in cui detta formulazione è idonea per la somministrazione parenterale a un soggetto, per esempio, un soggetto umano (per esempio un paziente avente un disturbo vWF-correlato). La formulazione può essere somministrata al soggetto

mediante iniezione (per esempio endovenosa, sottocutanea, intramuscolare o intraperitoneale).

[0029] Inoltre, la presente descrizione fornisce una formulazione come descritta nel presente documento, per uso in un metodo per trattare un soggetto umano o animale, preferibilmente per uso nel trattamento di disordini vWF-correlati, come per esempio sindrome coronarica acuta (ACS), attacco ischemico cerebrale transitorio, angina pectoris instabile o stabile, ictus, infarto miocardico o porpora trombotica trombocitopenica (TTP), maggiormente preferibilmente per uso nel trattamento di TTP o ACS. Inoltre, la presente descrizione riguarda un metodo o processo per preparare la formulazione come descritta nel presente documento. Il metodo o processo include esprimere il legante del vWF in una coltura cellulare; purificare il legante del vWF, per esempio facendo passare il legante del vWF attraverso almeno una tra una fase di purificazione mediante cromatografia, una fase di ultrafiltrazione/diafiltrazione; regolare la concentrazione del legante del vWF, per esempio a da circa 0,1 a 80 mg/ml in una formulazione contenente un lioprotettore, un tensioattivo e un tampone come descritti nel presente documento, per esempio

saccarosio a una concentrazione da circa l'1% a circa il 15%; Tween-80 a una concentrazione da circa lo 0,001% a circa lo 0,5% (p/v); e un tampone citrato a una concentrazione da circa 5 mM a circa 200 mM, in modo che il pH della formulazione sia da circa 6,0 a 7,0; e opzionalmente comprendente una fase di confezionare la formulazione in una forma di dosaggio unitario.

[0030] La descrizione include anche un metodo o processo per preparare una formulazione ricostituita contenente un legante del vWF, per esempio ALX-0081 come descritto nel presente documento. Il metodo include: liofilizzare una miscela di un legante del vWF, un lioprotettore, un tensioattivo e un tampone, in tal modo formando una miscela liofilizzata; e ricostituire la miscela liofilizzata in un diluente, in tal modo preparando una formulazione come descritta nel presente documento. In particolare, la formulazione include (a) un legante del vWF, per esempio ALX-0081 a una concentrazione da circa 0,1 a circa 80 mg/ml; (b) saccarosio a una concentrazione da circa l'1% a circa il 15% (p/v); (c) Tween-80 a una concentrazione da circa lo 0,001% a circa lo 0,5% (v/v); e (d) un tampone citrato a una concentrazione da circa 5 a circa 200 mM,

in modo che il pH della formulazione sia da circa 6 a 7,0; e opzionalmente comprendente una fase di confezionare la formulazione in una forma di dosaggio unitario.

[0031] La presente descrizione si riferisce inoltre a un metodo per stabilizzare un legante del vWF, preferibilmente un polipeptide comprendente almeno una tra le SEQ ID NO: 1-19 per la conservazione, comprendente preparare una formulazione come definita nel presente documento.

[0032] In aggiunta, la descrizione si riferisce a un metodo per conservare un legante del vWF, preferibilmente un polipeptide comprendente almeno una tra le SEQ ID NO: 1-19, comprendente preparare una formulazione come definita nel presente documento.

[0033] Sono anche fornite composizioni farmaceutiche o diagnostiche comprendenti qualsiasi delle formulazioni descritte nel presente documento od ottenibili mediante i metodi descritti nel presente documento.

[0034] Inoltre, la descrizione include un metodo per analizzare un prodotto o un processo, per esempio, un processo di fabbricazione. Il metodo include fornire una formulazione di un legante del vWF, per esempio ALX-0081 come descritto nel presente documento, e

valutare un parametro della formulazione, come colore, trasparenza, viscosità o una quantità di una o più specie HMW, LMW, come descritto nel presente documento. La valutazione può includere un accertamento di uno o più parametri, come determinare se il parametro soddisfa un criterio preselezionato, per esempio determinare se il criterio preselezionato è presente, o è presente in un intervallo preselezionato, in tal modo analizzando il processo. Per esempio, la valutazione del processo include una misura della stabilità della formulazione del legante del vWF. La stabilità della formulazione di ALX-0081 può essere misurata, per esempio in base alla formazione di aggregati, che viene analizzata, per esempio mediante cromatografia liquida ad alta pressione a esclusione dimensionale (SE-HPLC), in base a colore, trasparenza o viscosità come descritto nel presente documento.

[0035] In aggiunta, il metodo può inoltre comprendere confrontare due o più formulazioni campione in un metodo per monitorare o controllare una variazione tra i lotti, confrontare una preparazione con uno standard di riferimento, classificare, selezionare, accettare o scartare, rilasciare o trattenere, processare in un prodotto farmaceutico, trasportare, spostare in un

luogo diverso, formulare, etichettare o confezionare la formulazione, in base al confronto. Inoltre, il metodo può anche comprendere fornire una documentazione che include dati relativi al parametro valutato della formulazione e opzionalmente include un identificatore per un lotto della formulazione; sottoporre detta documentazione a un decisore; opzionalmente, ricevere una comunicazione da detto decisore; opzionalmente, decidere se rilasciare o commercializzare il lotto della formulazione in base alla comunicazione dal decisore.

[0036] Sono anche forniti kit o articoli di fabbricazione comprendenti la formulazione della descrizione e istruzioni per l'uso da parte, per esempio, di un professionista sanitario. I kit o gli articoli di fabbricazione possono includere un flacone o una siringa contenente la formulazione della descrizione come descritta nel presente documento. Preferibilmente, il flacone o la siringa è composta da vetro, plastica o un materiale polimerico scelto tra un polimero o un copolimero olefinico ciclico. Inoltre, la formulazione può anche essere presente in un dispositivo iniettabile (per esempio una siringa iniettabile, per esempio una siringa iniettabile

preriempiata).

[0037] La descrizione fornisce inoltre forme farmaceutiche di dosaggio unitario comprendenti le formulazioni stabili della descrizione che sono idonee per la somministrazione parenterale (per esempio per via intradermica, per via intramuscolare, per via intraperitoneale, per via endovenosa e per via sottocutanea) della formulazione della descrizione a un paziente umano.

[0038] Inoltre, le formulazioni della descrizione possono essere usate per la conservazione di un legante del vWF, preferibilmente un polipeptide comprendente almeno una tra le SEQ ID NO: 1-19, come ALX-0081 come descritto nel presente documento, in cui detta conservazione è di da 1 a 36 mesi, come di 1, 1,5, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 o 36 mesi, preferibilmente di almeno 12 mesi, per esempio a una temperatura tra -70 °C e +40 °C, come di -70 °C, -20 °C, +5 °C, +25 °C o +40 °C, preferibilmente a una temperatura tra -70 °C e +25 °C.

[0039] La presente descrizione si riferisce anche a un metodo per trattare o prevenire un disturbo vWF-correlato, come per esempio sindrome coronarica acuta (ACS), attacco ischemico cerebrale transitorio, angina

pectoris instabile o stabile, ictus, infarto miocardico o porpora trombotica trombocitopenica (TTP); detto metodo comprendendo somministrare a un soggetto una composizione farmaceutica comprendente la formulazione della descrizione, in tal modo riducendo uno o più sintomi associati a detto disturbo vWF-correlato. In particolare, detto disturbo vWF-correlato è la TTP.

4. Breve descrizione delle figure

[0040]

Fig. 1 Diagramma di flusso che rappresenta le diverse fasi del programma di liofilizzazione standard di 65 ore eseguito per ALX-0081.

Fig. 2A Parte rilevante dei cromatogrammi RP-HPLC di ALX-0081 dopo 1 e 2 mesi di conservazione a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$; mAU: unità di milliassorbanza.

Fig. 2B Ingrandimento della parte rilevante dei cromatogrammi RP-HPLC di ALX-0081 dopo 0, 4 e 8 settimane di incubazione a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Si osserva divisione del picco principale RP-HPLC come conseguenza di incubazione prolungata a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (0, 4, 8 settimane); mAU: unità di milliassorbanza.

Fig. 3A Sovrapposizione dei profili SE-HPLC di bianco di tampone citrato (bcb, blank citrate buffer) e ALX-0081 in citrato 20 mM pH 7,0 a 55,9 mg/ml prima (a) e

dopo 10 cicli di congelamento-scongelo (FT) a -20 °C (c) e -70 °C (b) ($\lambda = 280$ nm). È stato osservato un picco minore di citrato per i campioni pre-diluiti nel tampone di corsa; mAU: unità di milliassorbanza.

Fig. 3B Sovrapposizione dei profili SE-HPLC di bianco di tampone citrato (bcb) e ALX-0081 in citrato 20 mM pH 7,0 a 55,9 mg/ml dopo ± 1 settimana di conservazione a $+4$ °C ($\lambda = 280$ nm). ALX-0081 si è risolto in un picco principale (97%) corrispondente ad ALX-0081 intatto immutato e in piccoli pre-picchi che rappresentano solo il 3% dell'area superficiale totale. È stato osservato un picco minore di citrato per ALX-0081 pre-diluito in tampone di corsa; mAU: unità di milliassorbanza.

Fig. 4A Intensità di diffusione di campioni mescolati di ALX-0081 in citrato 50 mM pH 6,0, citrato 50 mM pH 6,0 + Tween-80 allo 0,01% (v/v) e citrato 50 mM pH 6,0 + Tween-80 allo 0,02% (v/v) a $+25$ °C. '+' rappresentano campioni in citrato 50 mM pH 6,0 ($y=0,0044x + 3,5962$, $R^2=0,9549$); 'o' rappresentano campioni in citrato 50 mM pH 6,0 + Tween-80 allo 0,02% (v/v) ($y=0,0002x + 1,0447$, $R^2=0,4673$); 'x' rappresentano campioni in citrato 50 mM pH 6,0 + Tween-80 allo 0,01% (v/v) ($y=0,0004x + 0,5125$, $R^2=0,6804$); (asse x = tempo in secondi; asse y =

intensità di diffusione).

Fig. 4B Intensità di diffusione di campioni mescolati di ALX-0081 in citrato 50 mM pH 6,5, citrato 50 mM pH 6,5 + Tween-80 allo 0,01% (v/v) e citrato 50 mM pH 6,5 + Tween-80 allo 0,02% (v/v) a +25 °C. '+' rappresentano campioni in citrato 50 mM pH 6,5 ($y=0,0041x + 4,7667$, $R^2=0,9431$); 'o' rappresentano campioni in citrato 50 mM pH 6,5 + Tween-80 allo 0,02% (v/v) ($y=0,0004x - 0,0208$, $R^2=0,9391$); 'x' rappresentano campioni in citrato 50 mM pH 6,5 + Tween-80 allo 0,01% (v/v) ($y=0,0001x - 1,8853$, $R^2=0,0376$); (asse x = tempo in secondi; asse y = intensità di diffusione).

Fig. 5 Sovrapposizione dei profili cIEF di ALX-0081 a 5 mg/ml in D-PBS + glicina 200 mM + Tween-80 allo 0,01% dopo 1 mese di conservazione a +40 °C (a) e -70 °C (b); ($\lambda = 280$ nm). AU: unità di assorbanza; pxlpos: posizione dei pixel.

Fig. 6 Immagine di formulazioni liofilizzate di ALX-0081 (forma 3 = citrato/saccarosio pH 6,0; forma 7 = citrato/saccarosio pH 6,5; forma 17 = D-PBS/glicina) prima (pannello A) e dopo ricostituzione con acqua Milli-Q (pannello B).

Fig. 7 Immagine di formulazioni liofilizzate di ALX-0081 a base di citrato/saccarosio.

Fig. 8 Immagini di formulazioni liquide di ALX-0081 a 28 mg/ml contenenti citrato 15, 20, 25, 30, 40 e 50 mM pH 6,5 dopo 4 giorni di conservazione a +25 °C (pannello A) o +5 °C (pannello B). Il bianco di tampone citrato (50 mM) è incluso come riferimento.

Fig. 9 Immagini di formulazioni liquide di ALX-0081 a 20 mg/ml contenenti citrato 15 mM pH 6,5 e quantità diverse di saccarosio e Tween-80 dopo 4 giorni di conservazione a +25 °C (pannello A) o +5 °C (pannello B). Il bianco di tampone citrato (50 mM) è incluso come riferimento.

Fig. 10 Predizione della percentuale di piroglutammato in un prodotto farmaceutico liofilizzato di ALX-0081 in funzione del tempo quando conservato a +5 °C.

Fig. 11 Predizione della percentuale di piroglutammato in un prodotto farmaceutico liofilizzato di ALX-0081 in funzione del tempo quando conservato a +25 °C.

5. Descrizione dettagliata dell'invenzione

[0041] A meno che diversamente indicato, tutti i metodi, le fasi, le tecniche e le manipolazioni che non sono specificatamente descritti in dettaglio possono essere eseguiti e sono stati eseguiti in un modo noto di per sé, come risulterà evidente alla persona esperta. Per esempio viene fatto nuovamente riferimento

ai manuali standard e alla tecnica nota generale menzionati nel presente documento e agli ulteriori riferimenti ivi citati; nonché per esempio alle seguenti rassegne: Presta, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006, 58 (5-6): 640-56; Levin e Weiss, *Mol. Biosyst.* 2006, 2(1): 49-57; Irving et al., *J. Immunol. Methods*, 2001, 248(1-2), 31-45; Schmitz et al., *Placenta*, 2000, 21 Suppl. A, S106-12, Gonzales et al., *Tumour Biol.*, 2005, 26(1), 31-43, che descrivono tecniche per l'ingegnerizzazione di proteine, come la maturazione per affinità e altre tecniche per migliorare la specificità e altre proprietà desiderate di proteine come le immunoglobuline.

[0042] È stato ora sorprendentemente riscontrato che i leganti del vWF, e in particolare ALX-0081 (SEQ ID NO: 1), possono essere somministrati in particolari regimi di dosaggio negli umani. È stato riscontrato che i leganti del vWF, e in particolare ALX-0081, producono un effetto farmacodinamico, con un esordio di azione rapido immediatamente alla fine del dosaggio e che mantiene la sua efficacia per fino a circa 12-24 ore. In aggiunta, è stato riscontrato che i leganti del vWF, e in particolare ALX-0081 (SEQ ID NO: 1), sono ben tollerati e sicuri in volontari maschi sani. Questi

risultati indicano che i leganti del vWF, e in particolare ALX-0081 (SEQ ID NO: 1), sono idonei per il trattamento acuto in pazienti con angina stabile che si sottopongono a intervento coronarico percutaneo (qui nel seguito anche "PCI") elettivo e per il trattamento in pazienti con porpora trombotica trombocitopenica (qui nel seguito anche "TTP").

[0043] Ciononostante, le attuali formulazioni dei leganti del vWF, e in particolare ALX-0081 (SEQ ID NO: 1), somministrate a destinatari umani erano passibili di miglioramento.

[0044] L'invenzione di riformulazione per i leganti del vWF, e in particolare ALX-0081, descritti nel presente documento ha fornito una nuova formulazione a base di citrato/saccarosio con aumentata solubilità (fino a 80 mg/ml) e ha migliorato significativamente la stabilità alla conservazione del liquido (per esempio si verifica meno ossidazione quando si conserva la nuova formulazione rispetto alla formulazione originale nel suo stato liquido). Inoltre, nella forma liofilizzata, non si è potuta rilevare essenzialmente alcuna ossidazione o isomerizzazione dell'asp dopo 12 mesi di conservazione +40 °C o perfino dopo 24 mesi di conservazione a +40 °C. Si è osservata ancora una

formazione residua di piccole quantità di piroglutammato. Un'ulteriore ottimizzazione della concentrazione di citrato e saccarosio ha determinato una riduzione del tenore di umidità del prodotto liofilizzato, in tal modo minimizzando la velocità di formazione di piroglutammato residuo.

[0045] Di conseguenza la presente invenzione fornisce formulazioni liquide e liofilizzate stabili di leganti anti-vWF comprendenti ALX-0081. Sono anche descritti usi delle stesse per trattare o prevenire disturbi vWF-correlati.

5.1 Polipeptide/i usato/i nell'invenzione

[0046] I leganti del vWF usati nella presente descrizione sono tipicamente proteine o polipeptidi che si legano al Fattore di von Willebrand umano (vWF, SEQ ID NO: 20). I leganti del vWF sono proteine o polipeptidi comprendenti o consistenti di almeno una sequenza immunoglobulinica, come un dominio immunoglobulinico singolo variabile (ISVD). I leganti del vWF della presente descrizione sono proteine o polipeptidi comprendenti o consistenti delle SEQ ID NO: 1-19 e maggiormente preferibilmente della SEQ ID NO: 1. I leganti del vWF possono essere usati come terapia adiuvante per pazienti con ACS sottoposti a PCI o come

trattamento della porpora trombotica trombocitopenica (TTP). I termini "proteina", "polipeptide" e "sequenza amminoacidica" sono usati in modo intercambiabile nel presente documento. Quindi, una sequenza amminoacidica della descrizione è un legante del vWF.

[0047] Quindi, per esempio, i leganti del vWF idonei per uso nella descrizione possono includere i composti nella Tabella A-1, per esempio le SEQ ID NO: 1-19, o un composto avente l'80% o più, più preferibilmente l'85% o più, maggiormente preferito il 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o più, di identità di sequenza amminoacidica con un composto nella Tabella A-1 (si veda la sezione Definizione per "identità di sequenza").

[0048] Preferibilmente i leganti del vWF per uso nella descrizione sono composti 12A02H1-simili. Per gli scopi della presente descrizione un composto 12A02H1-simile è un composto che comprende 12A02H1 (ossia la SEQ ID NO: 19) o un composto avente l'80% o più, più preferibilmente l'85% o più, maggiormente preferibilmente il 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o più, di identità di sequenza amminoacidica (come ulteriormente definita nel presente documento) con 12A02H1 (SEQ ID NO: 19). Un legante del vWF particolarmente preferito è ALX-0081 (SEQ ID NO: 1).

[0049] Tutti i leganti del vWF sopra menzionati sono ben noti dalla letteratura. Ciò include la loro fabbricazione (si veda in particolare per esempio WO2006/122825, ma anche WO2004/062551). Per esempio, ALX-0081 viene preparato come descritto per esempio in WO2006/122825 o WO2009/115614.

[0050] A meno che diversamente indicato, il termine "sequenza immunoglobulinica" - usato nel presente documento per fare riferimento sia a un anticorpo a catena pesante sia a un anticorpo convenzionale a 4 catene - è usato come un termine generale per includere sia l'anticorpo intero, sia le singole catene dello stesso, nonché tutte le parti, i domini o i frammenti dello stesso (inclusi ma non limitati a domini o frammenti di legame all'antigene come rispettivamente i domini V_{HH} o i domini V_H/V_L). I termini molecola di legame all'antigene o proteina di legame all'antigene sono usati in modo intercambiabile con sequenza immunoglobulinica e includono domini immunoglobulinici singoli variabili, come Nanobodies®.

[0051] Forme di realizzazione dell'invenzione si riferiscono a sequenze immunoglobuliniche che sono domini immunoglobulinici singoli variabili, come sequenze di domini variabili della catena leggera (per

esempio una sequenza V_L) o sequenze di domini variabili della catena pesante (per esempio una sequenza V_H); più specificatamente, sequenze di domini variabili della catena pesante che derivano da un anticorpo convenzionale a quattro catene o sequenze di domini variabili della catena pesante che derivano da un anticorpo a catena pesante (per esempio una sequenza V_{HH}).

[0052] Il termine "dominio immunoglobulinico singolo variabile" definisce molecole in cui il sito di legame all'antigene è presente su e formato da un dominio singolo immunoglobulinico o frammenti idonei dello stesso. Ciò distingue i domini immunoglobulinici singoli variabili dalle immunoglobuline "convenzionali" o loro frammenti, in cui due domini immunoglobulinici, in particolare due domini variabili, interagiscono per formare un sito di legame all'antigene. Tipicamente, nelle immunoglobuline convenzionali, un dominio variabile della catena pesante (V_H) e un dominio variabile della catena leggera (V_L) interagiscono per formare un sito di legame all'antigene. In questo caso, le regioni determinanti la complementarità (CDR, complementarity determining regions) di entrambe V_H e V_L contribuiranno al sito di legame all'antigene, ossia

un totale di 6 CDR saranno implicate nella formazione del sito di legame all'antigene.

[0053] Al contrario, il sito di legame all'antigene di un dominio immunoglobulinico singolo variabile è formato da un dominio singolo V_H o V_L . Quindi, il sito di legame all'antigene di un dominio immunoglobulinico singolo variabile è formato da non più di tre CDR, per esempio una, due o tre CDR.

[0054] Il termine "dominio immunoglobulinico singolo variabile" quindi non comprende immunoglobuline convenzionali o loro frammenti che richiedono un'interazione di almeno due domini variabili per la formazione di un sito di legame all'antigene. Ciò vale anche per forme di realizzazione dell'invenzione che "comprendono" o "contengono" un dominio immunoglobulinico singolo variabile. Nel contesto della presente invenzione, tali forme di realizzazione escludono immunoglobuline convenzionali o loro frammenti. Quindi, una composizione che "comprende" o "contiene" un dominio immunoglobulinico singolo variabile può riferirsi per esempio a costrutti comprendenti più di un dominio immunoglobulinico singolo variabile. In alternativa, possono esservi ulteriori costituenti diversi dai domini

immunoglobulinici singoli variabili, per esempio agenti ausiliari di tipi diversi, etichette proteiche, coloranti, pigmenti e così via. Tuttavia, questi termini comprendono frammenti di immunoglobuline convenzionali in cui il sito di legame all'antigene è formato da un dominio singolo variabile.

[0055] Secondo l'invenzione, il polipeptide usato nell'invenzione, più specificatamente le sequenze immunoglobuliniche, può consistere di, o comprendere, uno o più dei seguenti: anticorpi di dominio o sequenze amminoacidiche che sono idonee per uso come anticorpi di dominio, anticorpi a dominio singolo o sequenze amminoacidiche che sono idonee per uso come anticorpi a dominio singolo, "dAb", o sequenze amminoacidiche che sono idonee per uso come dAb, o Nanobodies®, incluse ma non limitate a sequenze V_{HH} , come sequenze V_{HH} umanizzate o sequenze V_H camelizzate, e preferibilmente sono Nanobodies®.

[0056] La presente descrizione contempla frammenti idonei di domini immunoglobulinici singoli variabili. "Frammenti idonei" di domini immunoglobulinici singoli variabili si riferiscono a polipeptidi che contengono meno amminoacidi rispetto a un dominio immunoglobulinico singolo variabile nativo, ma che

presentano ancora attività di legame all'antigene (che quindi solitamente conterranno almeno alcuni dei residui amminoacidici che formano almeno una delle CDR, come ulteriormente descritto nel presente documento). Tali domini immunoglobulinici singoli variabili e frammenti maggiormente preferibilmente comprendono un ripiegamento immunoglobulinico o sono in grado di formare, in condizioni idonee, un ripiegamento immunoglobulinico. Più specificatamente, i domini immunoglobulinici singoli variabili e i loro frammenti sono tali da essere in grado di legarsi all'antigene target. Come tale, il dominio immunoglobulinico singolo variabile può per esempio comprendere una sequenza del dominio variabile della catena leggera (per esempio una sequenza V_L) o un suo frammento idoneo; o una sequenza del dominio variabile della catena pesante (per esempio una sequenza V_H o una sequenza V_{HH}) o un suo frammento idoneo; a condizione che sia in grado di formare un'unità singola di legame all'antigene (ossia un'unità funzionale di legame all'antigene che consiste essenzialmente del dominio immunoglobulinico singolo variabile, in modo che il dominio singolo di legame all'antigene non debba necessariamente interagire con un altro dominio variabile per formare un'unità

funzionale di legame all'antigene, come per esempio nel caso dei domini variabili che sono presenti per esempio in anticorpi convenzionali e frammenti scFv che devono necessariamente interagire con un altro dominio variabile - per esempio attraverso un'interazione V_H/V_L - per formare un dominio funzionale di legame all'antigene).

[0057] Le sequenze immunoglobuliniche della descrizione sono preferibilmente in forma essenzialmente isolata. Le sequenze immunoglobuliniche della descrizione possono anche far parte di una proteina o di un polipeptide della descrizione (come definito nel presente documento), che può comprendere o consistere essenzialmente di una o più sequenze amminoacidiche della descrizione e che opzionalmente possono ulteriormente comprendere una o più ulteriori sequenze amminoacidiche (tutte opzionalmente collegate tramite uno o più linker idonei). Per esempio e senza limitazione, l'una o più sequenze amminoacidiche della descrizione possono essere usate come un'unità di legame una tale proteina o un tale polipeptide, che può opzionalmente contenere una o più ulteriori sequenze amminoacidiche che possono servire come un'unità di legame, in modo da fornire un polipeptide

rispettivamente monovalente, multivalente o multispecifico della descrizione, tutti come descritti nel presente documento. Una tale proteina o un tale polipeptide può essere anche in forma essenzialmente isolata.

[0058] La descrizione si riferisce a sequenze immunoglobuliniche di origine diversa, comprendenti sequenze immunoglobuliniche di topo, ratto, coniglio, asino, umane e di camelidi. La descrizione include anche sequenze immunoglobuliniche completamente umane, umanizzate o chimeriche. Per esempio, la descrizione comprende sequenze immunoglobuliniche di camelidi e sequenze immunoglobuliniche di camelidi umanizzate o anticorpi di dominio camelizzati, per esempio dAb camelizzati come descritto da Ward et al. (si veda per esempio WO 94/04678 e Davies e Riechmann (1994 e 1996)). Inoltre, la descrizione comprende sequenze immunoglobuliniche fuse, per esempio formanti un costrutto multivalente e/o multispecifico (per polipeptidi multivalenti e multispecifici contenenti uno o più domini V_{HH} e la loro preparazione, si faccia riferimento anche a Conrath et al., J. Biol. Chem., Vol. 276, 7346-7350, 2001, nonché per esempio a WO96/34103 e WO99/23221), e sequenze immunoglobuliniche

comprendenti etichette o altre porzioni funzionali, per esempio tossine, marcature, sostanze radiochimiche e così via, che sono derivabili dalle sequenze immunoglobuliniche della presente descrizione. Domini immunoglobulinici singoli variabili sono stati descritti anche in squali (denominati anche "IgNAR", come descritto per esempio in WO03/014161 o Streltsov, 2005).

[0059] In una forma di realizzazione particolare, i domini immunoglobulinici singoli variabili della descrizione sono Nanobodies®, in particolare domini V_{HH} di camelidi, domini V_{HH} umanizzati o domini V_H camelizzati. La persona esperta conosce bene l'umanizzazione di domini V_{HH} e/o la camelizzazione di domini V_H .

[0060] La sequenza amminoacidica e la struttura di una sequenza immunoglobulinica, in particolare un Nanobody®, possono essere considerate - senza tuttavia essere limitate alle stesse - essere costituite da quattro regioni cornice, o "FR", che sono rispettivamente denominate nella tecnica e nel presente documento "Regione cornice 1" o "FR1"; "Regione cornice 2" o "FR2"; "Regione cornice 3" o "FR3"; e "Regione cornice 4" o "FR4"; le quali regioni cornice sono

interrotte da tre regioni determinanti la complementarità o "CDR", che sono rispettivamente denominate nella tecnica "Regione determinante la complementarità 1" o "CDR1"; "Regione determinante la complementarità 2" o "CDR2"; e "Regione determinante la complementarità 3" o "CDR3".

[0061] Il numero totale di residui amminoacidici in un Nanobody® può essere nella regione da 110 a 120, è preferibilmente da 112 a 115 ed è maggiormente preferibilmente di 113. Si deve tuttavia notare che parti, frammenti, analoghi o derivati (come ulteriormente descritto nel presente documento) di un Nanobody® non sono particolarmente limitati per quanto riguarda la loro lunghezza e/o dimensione, a condizione che tali parti, frammenti, analoghi o derivati soddisfino gli ulteriori requisiti indicati nel presente documento e siano anche preferibilmente idonei per gli scopi descritti nel presente documento.

[0062] Quindi, generalmente, i domini immunoglobulinici singoli variabili saranno sequenze amminoacidiche che consistono di, o consistono essenzialmente di, 4 regioni cornice (rispettivamente da FR1 a FR4) e 3 regioni determinanti la complementarità (rispettivamente da CDR1 a CDR3). "Consistere

essenzialmente" in questo contesto indica che possono essere presenti elementi aggiuntivi come per esempio etichette usate per la purificazione o la marcatura, ma tali elementi aggiuntivi sono piccoli rispetto al dominio immunoglobulinico singolo variabile di per sé e non interferiscono con l'attività di legame all'antigene del dominio immunoglobulinico singolo variabile.

[0063] Così come usato nel presente documento, il termine "sequenze immunoglobuliniche" o "domini immunoglobulinici singoli variabili" si riferisce sia alle sequenze di acidi nucleici che codificano per il polipeptide sia al polipeptide di per sé. Un eventuale significato più limitativo risulterà evidente dal contesto specifico.

[0064] In particolare, la sequenza amminoacidica della descrizione può essere un Nanobody® o un suo frammento idoneo. Per un'ulteriore descrizione di V_{HH} e Nanobodies, si fa riferimento all'articolo di rassegna di Muyldermans in Reviews in Molecular Biotechnology 74(2001), 277-302; nonché alle seguenti domande di brevetto, che sono menzionate come tecnica nota generale: WO94/04678, WO95/04079 e WO96/34103 della Vrije Universiteit di Bruxelles; WO94/25591,

WO99/37681, WO00/40968, WO00/43507, WO00/65057, WO01/40310, WO01/44301, EP1134231 e WO02/48193 di Unilever; WO97/49805, WO01/21817, WO03/035694, WO03/054016 e WO03/055527 del Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB); WO03/050531 di Algonomics N.V. e Ablynx N.V.; WO 01/90190 del National Research Council of Canada; WO03/025020 (= EP1433793) dell'Institute of Antibodies; nonché WO04/041867, WO04/041862, WO04/041865, WO04/041863, WO04/062551, WO05/044858, WO06/40153, WO06/079372, WO06/122786, WO06/122787 e WO06/122825, di Ablynx N.V., e alle ulteriori domande di brevetto pubblicate di Ablynx N.V. Si fa riferimento anche all'ulteriore tecnica nota menzionata in queste domande e in particolare all'elenco di riferimenti menzionati alle pagine da 41 a 43 della Domanda internazionale WO06/040153. Come descritto in questi riferimenti, i Nanobodies (in particolare le sequenze V_{HH} e i Nanobodies parzialmente umanizzati) possono essere in particolare caratterizzati dalla presenza di uno o più "residui distintivi" in una o più delle sequenze cornice. Si può trovare un'ulteriore descrizione dei Nanobodies, incluse l'umanizzazione e/o la camelizzazione di Nanobodies, nonché altre modifiche, parti o frammenti, derivati o "fusioni di

Nanobody", costrutti multivalenti (inclusi alcuni esempi non limitativi di sequenze linker) e modifiche diverse per aumentare l'emivita dei Nanobodies e della loro preparazione per esempio in W007/104529.

[0065] I domini immunoglobulinici singoli variabili forniti dalla descrizione sono preferibilmente in forma isolata o in forma essenzialmente isolata. Le sequenze immunoglobuliniche della descrizione possono anche fare parte di una proteina o di un polipeptide della descrizione, che può comprendere o consistere essenzialmente di uno o più domini immunoglobulinici singoli variabili e che opzionalmente può ulteriormente comprendere una o più ulteriori sequenze amminoacidiche (tutti opzionalmente collegati tramite uno o più linker idonei). Per esempio e senza limitazione, l'uno o più domini immunoglobulinici singoli variabili possono essere usati come un'unità di legame in una tale proteina o un tale polipeptide, che può opzionalmente contenere una o più ulteriori sequenze amminoacidiche che possono fungere da unità di legame, in modo da fornire rispettivamente un polipeptide monovalente, multivalente o multispecifico per uso nell'invenzione, tutti come descritti nel presente documento. Una tale proteina o un tale polipeptide può anche essere in

forma isolata o essenzialmente isolata. Quindi, secondo l'invenzione, i domini immunoglobulinici singoli variabili comprendono costrutti comprendenti due o più unità di legame all'antigene sotto forma di domini singoli, come sopra indicato. Per esempio, due (o più) domini immunoglobulinici singoli variabili con specificità per l'antigene uguale o diversa possono essere collegati per formare per esempio un costrutto bivalente, trivalente o multivalente. Combinando domini immunoglobulinici singoli variabili di due o più specificità, si possono formare costrutti bispecifici, trispecifici e così via. Per esempio, un polipeptide secondo la descrizione può comprendere due domini immunoglobulinici singoli variabili diretti contro un target A e un dominio immunoglobulinico singolo variabile contro un target B, rendendolo bivalente per A e monovalente per B. Tutti tali costrutti e modifiche degli stessi, che la persona esperta può facilmente concepire, sono contemplati dalla presente descrizione. In forme di realizzazione particolari, l'invenzione si riferisce a costrutti biparatopici comprendenti almeno due domini immunoglobulinici singoli variabili diretti a epitopi diversi all'interno dello stesso antigene target.

[0066] Tutte queste molecole sono anche denominate "polipeptide della descrizione", che è sinonimo di "sequenze immunoglobuliniche" o di "domini immunoglobulinici singoli variabili" della descrizione.

[0067] In aggiunta, il termine "sequenza" così come usato nel presente documento (per esempio in termini come "sequenza immunoglobulinica", "sequenza anticorpale", "sequenza di dominio variabile", "sequenza V_{HH}" o "sequenza proteica"), deve essere generalmente inteso includere sia la sequenza amminoacidica rilevante sia sequenze di acidi nucleici o sequenze nucleotidiche che codificano per la stessa, a meno che il contesto richieda un'interpretazione più limitata.

[0068] Secondo una forma di realizzazione non limitativa dell'invenzione, le sequenze immunoglobuliniche, il Nanobody® o il polipeptide della descrizione è glicosilato. Secondo un'altra forma di realizzazione non limitativa dell'invenzione, le sequenze immunoglobuliniche, il Nanobody® o il polipeptide della descrizione è non glicosilato.

5.2 "Legame" a un antigene

[0069] L'invenzione si riferisce a sequenze immunoglobuliniche che possono legarsi a e/o avere

affinità per un antigene, che è il fattore di von Willebrand. Nel contesto della presente invenzione, "legarsi a e/o avere affinità per" un certo antigene ha il significato usuale nella tecnica come inteso per esempio nel contesto degli anticorpi e dei loro rispettivi antigeni.

[0070] In forme di realizzazione particolari dell'invenzione, il termine "si lega a e/o avente affinità per" indica che la sequenza immunoglobulinica interagisce specificatamente con un antigene ed è usata in modo intercambiabile con sequenze immunoglobuliniche "contro" il detto antigene.

[0071] Il termine "specificità" si riferisce al numero di tipi diversi di antigeni o determinanti antigenici al quale una particolare sequenza immunoglobulinica, molecola di legame all'antigene o proteina di legame all'antigene (come un dominio immunoglobulinico singolo variabile, un Nanobody® o un polipeptide della descrizione) può legarsi. La specificità di una proteina di legame all'antigene può essere determinata in base all'affinità e/o all'avidità. L'affinità, rappresentata dalla costante di equilibrio per la dissociazione di un antigene con una proteina di legame all'antigene (KD), è una misura per la forza di legame

tra un determinante antigenico e un sito di legame all'antigene sulla proteina di legame all'antigene: minore è il valore della KD, maggiore è la forza di legame tra un determinante antigenico e la molecola di legame all'antigene (in alternativa, l'affinità può essere espressa anche come costante di affinità (KA), che è $1/KD$). Come risulterà evidente alla persona esperta (per esempio in base all'ulteriore descrizione nel presente documento), l'affinità può essere determinata in un modo noto di per sé, a seconda dell'antigene di interesse specifico. L'avidità è la misura della forza di legame tra una molecola di legame all'antigene (come un dominio immunoglobulinico singolo variabile, un Nanobody® o un polipeptide della descrizione) e l'antigene pertinente. L'avidità è correlata sia all'affinità tra un determinante antigenico e il suo sito di legame all'antigene sulla molecola di legame all'antigene e il numero di siti di legame pertinenti presenti sulla molecola di legame all'antigene.

[0072] Tipicamente, le sequenze immunoglobuliniche della presente descrizione (come le sequenze amminoacidiche, i domini immunoglobulinici singoli variabili, i Nanobodies® e/o i polipeptidi della

descrizione) si legheranno al loro antigene con una costante di dissociazione (KD) da 10^{-5} a 10^{-12} moli/litro o meno e preferibilmente da 10^{-7} a 10^{-12} moli/litro o meno e più preferibilmente da 10^{-8} a 10^{-12} moli/litro (ossia con una costante di associazione (KA) da 10^5 a 10^{12} litri/mole o più e preferibilmente da 10^7 a 10^{12} litri/mole o più e più preferibilmente da 10^8 a 10^{12} litri/mole) e/o si legano al loro antigene come definito nel presente documento con una velocità k_{on} tra $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e circa $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, preferibilmente tra $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, più preferibilmente tra $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, come tra $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; e/o si legano al loro antigene come definito nel presente documento con una velocità k_{off} tra 1 s^{-1} ($t_{1/2}=0,69 \text{ s}$) e 10^{-6} s^{-1} (fornendo un complesso quasi irreversibile con un $t_{1/2}$ di più giorni), preferibilmente tra 10^{-2} s^{-1} e 10^{-6} s^{-1} , più preferibilmente tra 10^{-3} s^{-1} e 10^{-6} s^{-1} , come tra 10^{-4} s^{-1} e 10^{-6} s^{-1} .

[0073] Qualsiasi valore di KD maggiore di 10^{-4} M (o qualsiasi valore di KA minore di 10^4 M^{-1}) è generalmente considerato indicare un legame aspecifico.

[0074] Preferibilmente, una sequenza immunoglobulinica monovalente della descrizione si legherà all'antigene desiderato con un'affinità minore di 500 nM,

preferibilmente minore di 200 nM, più preferibilmente minore di 10 nM, come minore di 500 pM.

[0075] Il legame specifico di una proteina di legame all'antigene a un antigene o a un determinante antigenico può essere determinato in qualsiasi modo idoneo noto di per sé, inclusi per esempio, l'analisi di Scatchard e/o saggi di legame competitivo, come saggi radioimmunologici (RIA, radioimmunoassays), saggi immunoenzimatici (EIA, enzyme immunoassays) e saggi di competizione a sandwich e le diverse varianti degli stessi note di per sé nella tecnica; nonché le altre tecniche menzionate nel presente documento.

[0076] La costante di dissociazione (KD) può essere la costante di dissociazione effettiva o apparente, come risulterà evidente alla persona esperta. Metodi per determinare la costante di dissociazione risulteranno evidenti alla persona esperta e per esempio includono le tecniche menzionate nel presente documento. A questo riguardo, risulterà anche evidente che potrebbe non essere possibile misurare costanti di dissociazione di più di 10^{-4} moli/litro o 10^{-3} moli/litro (per esempio di 10^{-2} moli/litro). Opzionalmente, come risulterà anche evidente alla persona esperta, la costante di dissociazione (effettiva o apparente) può essere

calcolata sulla base della costante di associazione (KA) (effettiva o apparente), per mezzo della relazione $[KD = 1/KA]$.

[0077] L'affinità indica la forza o la stabilità di un'interazione molecolare. L'affinità è comunemente indicata dalla KD, o costante di dissociazione, che ha unità di moli/litro (o M). L'affinità può anche essere espressa come una costante di associazione, KA, che è pari a $1/KD$ e ha unità di $(\text{moli/litro})^{-1}$ (o M^{-1}). Nella presente descrizione, la stabilità dell'interazione tra due molecole (come una sequenza amminoacidica, una sequenza immunoglobulinica, un dominio immunoglobulinico singolo variabile, un Nanobody® o un polipeptide della descrizione e il suo target inteso) sarà principalmente espressa in termini del valore di KD della loro interazione; essendo evidente alla persona esperta che, in considerazione della relazione $KA = 1/KD$, per calcolare il valore di KA corrispondente si può anche usare la specifica della forza dell'interazione molecolare mediante il suo valore di KD. Il valore di KD caratterizza la forza di un'interazione molecolare anche in un senso termodinamico in quanto è correlato all'energia libera (DG) del legame mediante la ben nota relazione

$DG=RT \cdot \ln(KD)$ (equivalentemente $DG=-RT \cdot \ln(KA)$), dove R è pari alla costante del gas, T è pari alla temperatura assoluta e \ln indica il logaritmo naturale.

[0078] La KD per le interazioni biologiche, come il legame delle sequenze immunoglobuliniche della descrizione al vWF come definito nel presente documento, che sono considerate significative (per esempio specifiche) è tipicamente nell'intervallo da 10^{-10} M (0,1 nM) a 10^{-5} M (10000 nM). Più forte è un'interazione, minore è la sua KD .

[0079] La KD può anche essere espressa come il rapporto tra la costante della velocità di dissociazione di un complesso, indicata con k_{off} , e la velocità della sua associazione, indicata con k_{on} (cosicché $KD = k_{off}/k_{on}$ e $KA = k_{on}/k_{off}$). La velocità off k_{off} ha unità s^{-1} (dove s è la notazione di secondo in unità SI). La velocità on k_{on} ha unità $M^{-1}s^{-1}$.

[0080] Per quanto riguarda le sequenze immunoglobuliniche della descrizione, la velocità on può variare tra 10^2 $M^{-1}s^{-1}$ e circa 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, avvicinandosi alla costante della velocità di associazione limitata dalla diffusione per le interazioni bimolecolari. La velocità off è correlata all'emivita di una determinata interazione molecolare

mediante la relazione $t_{1/2} = \ln(2)/k_{\text{off}}$. La velocità off delle sequenze immunoglobuliniche della descrizione può variare tra 10^{-6} s^{-1} (complesso quasi irreversibile con un $t_{1/2}$ di più giorni) e 1 s^{-1} ($t_{1/2} = 0,69 \text{ s}$).

[0081] L'affinità di un'interazione molecolare tra due molecole può essere misurata tramite tecniche diverse note di per sé, come la ben nota tecnica con biosensori a risonanza plasmonica superficiale (SPR, surface plasmon resonance) (si veda per esempio Ober et al., Intern. Immunology, 13, 1551-1559, 2001) dove una molecola viene immobilizzata sul chip del biosensore e l'altra molecola viene fatta passare sulla molecola immobilizzata in condizioni di flusso che consentono di ottenere le misurazioni k_{on} , k_{off} e quindi i valori di KD (o KA). Ciò può essere per esempio eseguito usando i ben noti strumenti Biacore.

[0082] Risulterà anche evidente alla persona esperta che la KD misurata può corrispondere alla KD apparente se il processo di misurazione in qualche modo influenza l'affinità di legame intrinseca delle molecole implicate per esempio mediante artefatti correlati all'applicazione sul biosensore di una molecola. Inoltre, una KD apparente può essere misurata se una molecola contiene più di un sito di riconoscimento per

l'altra molecola. In tale situazione l'affinità misurata può essere influenzata dall'avidità dell'interazione da parte delle due molecole.

[0083] Un altro approccio che può essere usato per valutare l'affinità è la procedura ELISA (saggio immunoassorbente legato a un enzima) bifase di Friguet et al. (*J. Immunol. Methods*, 77, 305-19, 1985). Questo metodo stabilisce una misurazione dell'equilibrio di legame in fase di soluzione ed evita possibili artefatti correlati all'adsorbimento di una delle molecole su un supporto come plastica.

[0084] Tuttavia, la misurazione accurata della KD può essere piuttosto laboriosa e, come conseguenza, spesso per valutare la forza di legame di due molecole vengono determinati valori di KD apparente. Si deve notare che, a condizione che tutte le misurazioni siano fatte in modo uniforme (per esempio mantenendo invariate le condizioni di saggio), le misurazioni della KD apparente possono essere usate come un'approssimazione della vera KD e quindi nel presente documento la KD e la KD apparente devono essere trattate con pari importanza o rilevanza.

[0085] Infine, si deve notare che in molte situazioni il ricercatore esperto può giudicare conveniente

determinare l'affinità di legame in relazione a qualche molecola di riferimento. Per esempio, per valutare la forza di legame tra molecole A e B, si può per esempio usare una molecola di riferimento C che è nota legarsi a B e che è idoneamente marcata con un gruppo fluoroforo o cromoforo o altra porzione chimica, come biotina, per la facile rivelazione in un ELISA o FACS (selezione cellulare attivata da fluorescenza, Fluorescent activated cell sorting) o altro formato (il fluoroforo per la rivelazione a fluorescenza, il cromoforo per la rivelazione per assorbimento di luce, la biotina per la rivelazione mediante ELISA mediato da streptavidina). Tipicamente, la molecola di riferimento C viene mantenuta a una concentrazione fissa e la concentrazione di A viene variata in base a una determinata concentrazione o quantità di B. Di conseguenza si ottiene un valore di IC50 corrispondente alla concentrazione di A alla quale il segnale misurato per C in assenza di A è dimezzato. A condizione che KD_{ref} , la KD della molecola di riferimento, sia nota, come anche la concentrazione totale c_{ref} della molecola di riferimento, la KD apparente per l'interazione A-B può essere ottenuta dalla seguente formula: $KD = IC50 / (1 + c_{ref} / KD_{ref})$. Si noti che se $c_{ref} \ll KD_{ref}$,

KD \approx IC50. A condizione che la misurazione dell'IC50 sia eseguita in un modo uniforme (per esempio mantenendo fissa la cref) per i leganti che vengono confrontati, la forza o la stabilità di un'interazione molecolare può essere valutata mediante l'IC50 e questa misurazione viene giudicata equivalente alla KD o alla KD apparente in tutto questo testo.

5.3 Antigene target

[0086] I domini immunoglobulinici singoli variabili della presente descrizione si legano al e/o hanno affinità per il vWF. Nel contesto della presente invenzione, "vWF" include, ma non è limitato a, vWF di scimmia cinomolgo, babbuino, maiale, cavia, topo e/o umano e maggiormente preferito vWF umano, ossia la SEQ ID NO: 20 o il numero GenBank: NP_000543.

5.4 Forme di realizzazione specifiche di sequenze immunoglobuliniche

[0087] La presente invenzione si riferisce a domini immunoglobulinici singoli variabili descritti nei, o ottenibili mediante i, metodi come descritti in WO2004/015425, WO2004/062551, WO2006/074947, WO2006/122825, WO2009/115614, o WO2011/067160, tutti a nome del presente richiedente.

[0088] L'invenzione si riferisce anche a varianti

ottimizzate di queste sequenze amminoacidiche. Generalmente, una "variante ottimizzata" di una sequenza amminoacidica secondo la descrizione è una variante che comprende una o più sostituzioni vantaggiose come una sostituzione che aumenta i) il grado di "umanizzazione", ii) la stabilità chimica e/o iii) il livello di espressione; mentre la potenza (misurata per esempio mediante il saggio di potenza come descritto nella parte sperimentale di WO2006/122825 rimane comparabile (ossia entro una deviazione del 10%) a quella del tipo selvaggio 12A02 (come definito in WO2006/122825) o comparabile alla variante 12A02H1 (SEQ ID NO: 19), anch'essa come definita in WO2006/122825. Preferibilmente, rispetto alla sequenza di tipo selvaggio di 12A02, una sequenza amminoacidica della descrizione contiene almeno una tale sostituzione e preferibilmente almeno due tali sostituzioni e preferibilmente almeno tre sostituzioni umanizzanti e preferibilmente almeno 10 tali sostituzioni umanizzanti.

[0089] In un particolare aspetto, le sequenze amminoacidiche della descrizione contengono un totale tra 1 e 15, preferibilmente tra 2 e 14, come tra 9 e 13, per esempio di 10, 11 o 12 sostituzioni

amminoacidiche rispetto alla sequenza di tipo selvaggio 12A02. Come menzionato, queste differenze preferibilmente comprendono almeno una e preferibilmente almeno due, come tre, quattro o cinque o dieci sostituzioni umanizzanti e possono opzionalmente comprendere una o più ulteriori sostituzioni (come una qualsiasi tra le, o qualsiasi combinazione idonea di qualsiasi due o più delle, ulteriori sostituzioni da (a) a (c) come menzionate nel presente documento). Anche in questo caso, in base alla descrizione nel presente documento e opzionalmente dopo un grado limitato di prova ed errore, la persona esperta sarà in grado di selezionare (una combinazione idonea di) una o più di tali sostituzioni umanizzanti idonee e/o ulteriori sostituzioni.

[0090] La presente descrizione contempla sequenze polipeptidiche che sono altamente simili a qualsiasi degli esempi specifici forniti nel presente documento o a qualsiasi degli esempi specifici sopra definiti a titolo di riferimento.

[0091] Altamente simile indica un'identità amminoacidica almeno del 90%, per esempio del 95, 97, 98 o 99%. Le sequenze polipeptidiche altamente simili avranno la stessa funzione della sequenza da cui

derivano, ossia si legheranno al vWF, più specificatamente si legheranno al vWF e ne inibiranno l'interazione con le piastrine.

[0092] In una forma di realizzazione particolare, l'invenzione si riferisce a sequenze altamente simili a una qualsiasi tra le SEQ ID NO: 1-19, in particolare alla SEQ ID NO: 1. Tuttavia, per ciascuna variante deve essere valutata la stabilità della sequenza nella formulazione come definita nel presente documento, cosicché l'invenzione in particolare si riferisce a varianti o sequenze altamente simili che sono stabili nelle formulazioni come definite nel presente documento.

[0093] I metodi per generare le sequenze polipeptidiche della descrizione sono ampiamente noti e includono per esempio l'espressione o la sintesi ricombinante. La persona esperta conosce bene la tecnologia di espressione idonea, per esempio vettori ricombinanti e cellule ospite idonei, per esempio cellule ospite batteriche o di lievito. La persona esperta conosce anche bene le tecniche e i protocolli di purificazione idonei.

5.5 Formulazioni dell'invenzione

[0094] La presente invenzione fornisce formulazioni di

polipeptidi diretti contro il vWF, per esempio domini immunoglobulinici singoli variabili (ISVD) o polipeptidi comprendenti almeno un dominio immunoglobulinico singolo variabile, che sono stabili e preferibilmente idonee per usi farmaceutici, compresa la preparazione di medicinali.

[0095] Una formulazione di un legante del vWF, per esempio un ISVD, include un ISVD, un composto che può fungere da crioprotettore e/o lioprotettore e un tampone. Il pH della formulazione della descrizione è generalmente un pH da 5 a 7,5. In alcune forme di realizzazione, una formulazione viene conservata sotto forma di un liquido. In altre forme di realizzazione, una formulazione viene preparata sotto forma di un liquido e quindi viene essiccata, per esempio mediante liofilizzazione o essiccamento a spruzzo, prima della conservazione. Una formulazione essiccata (ossia il liofilizzato) può essere usata come un composto anidro, per esempio sotto forma di un aerosol o di una polvere, o ricostituita alla sua concentrazione originale o a una diversa, per esempio usando acqua, un tampone o altro liquido appropriato (diluente).

[0096] Il processo di purificazione del legante del vWF è progettato per consentire il trasferimento del

legante del vWF in una formulazione idonea per la conservazione a lungo termine, per esempio sotto forma di un liquido congelato, e/o successivamente per il crioessiccamento (per esempio usando una formulazione di citrato/saccarosio). La formulazione viene liofilizzata con la proteina, per esempio il legante del vWF, a una concentrazione specifica. La formulazione liofilizzata può quindi essere ricostituita come necessario con un diluente idoneo (per esempio acqua) per risolubilizzare i componenti della formulazione originale a una concentrazione desiderata, generalmente una concentrazione uguale o maggiore rispetto alla concentrazione prima della liofilizzazione. La formulazione liofilizzata può essere ricostituita per produrre una formulazione che ha una concentrazione che differisce dalla concentrazione originale (ossia prima della liofilizzazione), a seconda della quantità di diluente aggiunta al liofilizzato in relazione al volume di liquido che era stato originariamente crioessiccato. Le formulazioni idonee possono essere identificate analizzando uno o più parametri di integrità del legante del vWF. I parametri analizzati sono generalmente la percentuale di specie ad alto peso

molecolare (HMW, High Molecular Weight) o la percentuale di specie a basso peso molecolare (LMW, Low Molecular Weight) mediante HPLC a esclusione dimensionale (SE-HPLC, Size Exclusion HPLC).

[0097] Di conseguenza, la presente invenzione fornisce formulazioni caratterizzate da un grado di purezza idoneo e a concentrazioni idonee come necessario per esempio per scopi farmaceutici. Le formulazioni forniscono i polipeptidi, per esempio domini immunoglobulinici singoli variabili o polipeptidi comprendenti almeno un dominio immunoglobulinico singolo variabile come definiti nel presente documento, in una forma stabile in un ampio intervallo di concentrazioni, e in un ampio intervallo di condizioni di conservazione, per esempio temperature, incluse condizioni stressate come temperature elevate (per esempio di +25 °C o più alte), liofilizzazione, agitazione o altre forme di stress fisico.

[0098] La formulazione comprende un vettore acquoso. Il vettore acquoso è in particolare un tampone.

[0099] L'invenzione, tuttavia, contempla anche prodotti ottenibili mediante ulteriore lavorazione di una formulazione liquida, come un prodotto congelato,

liofilizzato o essiccato a spruzzo. Dopo ricostituzione, questi prodotti solidi possono diventare formulazioni liquide come descritto nel presente documento (ma non sono limitate alle stesse). Pertanto, nel suo senso più ampio, il termine "formulazione" contempla formulazioni sia liquide sia solide. Tuttavia, le formulazioni solide sono intese come derivabili dalle formulazioni liquide (per esempio mediante congelamento, crioessiccamento o essiccamento a spruzzo) e quindi hanno varie caratteristiche che sono definite dalle peculiarità specificate per le formulazioni liquide nel presente documento. L'invenzione non esclude la ricostituzione che determina una composizione che devia dalla composizione originale per esempio prima del crioessiccamento o dell'essiccamento a spruzzo.

[0100] Le formulazioni della descrizione comprendono almeno un legante del vWF, in particolare domini immunoglobulinici singoli variabili o un polipeptide comprendente almeno un dominio immunoglobulinico singolo variabile come definito nel presente documento. In particolare, la formulazione comprende uno o più polipeptidi selezionati dalle SEQ ID NO: 1-19, preferibilmente la SEQ ID NO: 1. In aggiunta l'emivita

dei polipeptidi può essere estesa per esempio incorporando un peptide di legame o un dominio di legame all'albumina sierica, che può essere qualsiasi peptide di legame o dominio di legame all'albumina sierica in grado di aumentare l'emivita del costrutto (rispetto allo stesso costrutto senza il peptide di legame o dominio di legame all'albumina sierica) e in particolare possono essere peptidi di legame all'albumina sierica come descritti in WO2008/068280 del richiedente (e in particolare in WO2009/127691 e WO2011/095545, entrambi del richiedente) o un dominio immunoglobulinico singolo variabile di legame all'albumina sierica (come un Nanobody di legame all'albumina sierica; per esempio Alb-1 o una versione umanizzata di Alb-1 come Alb-8, per il quale si fa riferimento per esempio a WO06/122787). Mezzi alternativi per estendere l'emivita che sono anch'essi contemplati dalla presente descrizione includono per esempio la pegilazione (PEG) come ampiamente nota nella tecnica, inclusa la pegilazione sito-specifica o casuale, preferibilmente la pegilazione sito-specifica. Può essere usato PEG con un peso molecolare al di sopra di 5000, per esempio tra 10.000 e 200.000, preferibilmente nell'intervallo tra 20.000 e 100.000.

In qualsiasi aspetto di estensione dell'emivita, è previsto che l'attività del polipeptide come definito nel presente documento non sia compromessa, per esempio mantenga almeno il 75%, 80%, 85%, 90% o 95% dell'attività dello stesso polipeptide senza estensione dell'emivita. L'attività può riguardare per esempio il legame all'antigene target e/o la potenza in un saggio biologico. La persona esperta accerterà anche che la tecnologia di estensione dell'emivita scelta sia idonea in quanto non aumenta, o perfino diminuisce, l'immunogenicità.

5.5.1 Tampone

[0101] La formulazione della descrizione comprende un tampone selezionato tra almeno uno di tampone citrato o fosfato, preferibilmente un tampone citrato. In una forma di realizzazione particolare, il tampone citrato viene preparato usando acido citrico monoidrato e citrato trisodico diidrato, per esempio 0,2154 g/l di acido citrico monoidrato e 5,5805 g/l di citrato trisodico diidrato. Come determinato misurando le temperature di fusione in un esempio non limitativo, questi tamponi migliorano la stabilità dei leganti del vWF, rispetto ad altri tamponi testati.

[0102] La formulazione secondo la descrizione comprende

un tampone citrato a una concentrazione nell'intervallo da 5 a 200 mM, per esempio di 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 mM, preferibilmente da 5 a 100 mM, più preferibilmente da 7,5 a 80 mM, ancora più preferibilmente da 10 a 50, per esempio di 10, 15, 20, 25 o 30 mM e maggiormente preferibilmente di 20 mM, in cui ciascun valore è inteso contemplare opzionalmente un intervallo di ± 5 mM. La formulazione secondo la descrizione può comprendere un tampone fosfato a una concentrazione nell'intervallo da 5 a 200 mM, per esempio di 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 mM, preferibilmente da 5 a 80 mM, più preferibilmente da 7,5 a 60 mM, ancora più preferibilmente da 10 a 40, per esempio di 10, 15, 20, 25 o 30 mM e maggiormente preferibilmente di 10 mM, in cui ciascun valore è inteso contemplare opzionalmente un intervallo di ± 5 mM. Si comprenderà che una concentrazione inferiore del tampone ha un effetto sull'osmolalità finale e parimenti sui soluti aggiuntivi che potrebbero dover essere aggiunti.

[0103] Il pH della formulazione della descrizione è nell'intervallo da 5,0 a 7,5, in cui ciascun valore è

inteso contemplare un intervallo di $\pm 0,2$. Esempi specifici di valori di pH preferiti per le formulazioni della descrizione possono essere selezionati dall'elenco non limitativo comprendente pH di 5,0, 5,5, 5,8, 6,0, 6,2, 6,5, 6,7, 7,0, 7,1, 7,2 o 7,5, preferibilmente da 6,0 a 7,0, più preferibilmente di 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8 o 6,9, per esempio di 6,5, in cui ciascun valore è inteso contemplare opzionalmente un intervallo di $\pm 0,2$.

[0104] Inaspettatamente, i tamponi citrato e fosfato hanno intervalli di pH in sovrapposizione per esempio con tamponi di istidina e Tris-HCl, tuttavia favoriscono la stabilità.

[0105] Il pH più vantaggioso dipenderà dal tampone compreso nella formulazione. Quindi, la descrizione si riferisce in particolare a una formulazione comprendente un tampone fosfato, che preferibilmente ha un pH nell'intervallo da 6,5 a 7,5, preferibilmente di 6,9, 7,0, 7,1, per esempio di 7,1.

[0106] È stato dimostrato che una formulazione comprendente un tampone citrato era particolarmente idonea per la conservazione e l'uso. Tuttavia, in contrasto con l'opinione diffusa, le formulazioni liquide comprendenti un tampone citrato erano

maggiormente stabili a un pH di circa 6,0, mentre le formulazioni liofilizzate comprendenti un tampone citrato erano maggiormente stabili a un pH di circa 6,5. Quindi, la presente descrizione si riferisce a una formulazione comprendente un tampone citrato, che preferibilmente ha un pH tra 6,0 e 7,0, più preferibilmente di 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8 o 6,9, per esempio di 6,5, in cui ciascun valore è inteso contemplare opzionalmente un intervallo di $\pm 0,2$.

5.5.2 Concentrazione

[0107] Le formulazioni della descrizione comprendono i leganti del vWF come definiti nel presente documento, in particolare i domini immunoglobulinici singoli variabili o i polipeptidi comprendenti almeno un dominio immunoglobulinico singolo variabile a una concentrazione che è idonea per scopi clinici, che include concentrazioni usate in soluzioni madre per la diluizione prima dell'uso sul paziente. Oltre a una stabilizzazione migliorata, le formulazioni della descrizione consentono concentrazioni più alte dei leganti del vWF, per esempio ISVD o polipeptidi. In particolare, le formulazioni della descrizione rimanevano fisicamente stabili, ossia l'assenza di torbidità e/o formazione di piccole particelle, come

confermato mediante ispezione visiva, microscopia, SE-HPLC e DLS. La conservazione a temperature elevate per tempi prolungati e cicli di congelamento-scongelo ripetuti apparentemente non influivano sulla stabilità fisica dei leganti del vWF in queste formulazioni.

[0108] Concentrazioni tipiche dell'agente attivo, per esempio dei leganti del vWF o dei polipeptidi della descrizione, nelle formulazioni della descrizione comprendono gli esempi non limitativi di concentrazioni nell'intervallo da 0,1 a 80 mg/ml, preferibilmente da 1 a 70 mg/ml, da 5 a 60 mg/ml, da 7,5 a 50 mg/ml o da 10 a 40 mg/ml, come di 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 60 mg/ml, preferibilmente di 12,5 mg/ml o 10 mg/ml, in cui ciascun valore è inteso contemplare opzionalmente un intervallo di $\pm 20\%$ (per esempio un valore di 10 opzionalmente contempla un intervallo da 8 a 12 mg/ml).

5.5.3 Eccipienti

[0109] Le formulazioni secondo la descrizione possono anche opzionalmente comprendere uno o più eccipienti. Il termine "eccipiente" così come usato nel presente documento si riferisce a una sostanza inerte che è comunemente usata come diluente, veicolo, conservante, lioprotettore, legante o agente stabilizzante per

composti che conferiscono una proprietà fisica vantaggiosa a una formulazione. La persona esperta ha familiarità con gli eccipienti idonei per scopi farmaceutici, che possono avere funzioni particolari nella formulazione, come lioprotezione, stabilizzazione, conservazione e così via. Gli stabilizzanti e i conservanti comunemente usati sono ben noti alla persona esperta (si veda per esempio WO2010/077422). I vettori farmaceuticamente accettabili che possono essere usati in queste composizioni includono, ma non sono limitati a, scambiatori ionici, allumina, stearato di alluminio, lecitina, proteine sieriche, come albumina sierica umana, sostanze tampone come fosfati, glicina, acido sorbico, sorbato di potassio, miscele di gliceridi parziali di acidi grassi vegetali saturi, acqua, sali o elettroliti, come solfato di protamina, idrogenofosfato di disodio, idrogenofosfato di potassio, cloruro di sodio, sali di zinco, silice colloidale, trisilicato di magnesio, polivinilpirrolidone, sostanze a base di cellulosa, polietilenglicole, sodio carbossimetilcellulosa, poliacrilati, cere, polimeri a blocchi polietilene-polioossipropilene, polietilenglicole e lanolina. In aspetti vantaggiosi della descrizione, l'eccipiente può

essere uno o più selezionati dall'elenco consistente di NaCl, trealosio, saccarosio, mannitolo o glicina.

[0110] Considerando la descrizione, la persona esperta può facilmente determinare concentrazioni idonee degli eccipienti da aggiungere alle formulazioni. In forme di realizzazione esemplificative, il NaCl ha una concentrazione nell'intervallo da 10 a 500 mM, come di 25, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 150, 250 o 500 mM, preferibilmente da 50 a 150 mM, per esempio di 75 o 140 mM, in cui ciascun valore è inteso contemplare opzionalmente un intervallo di ± 5 mM; e/o il mannitolo ha una concentrazione dall'1 al 10%, preferibilmente dal 2 al 4%, per esempio del 2, 3 o 4% (p/p), in cui ciascun valore è inteso contemplare opzionalmente un intervallo di $\pm 0,5\%$; e/o il saccarosio ha una concentrazione dall'1 al 15%, preferibilmente dal 2 al 12% o dal 4 al 10%, per esempio del 4, 5, 6, 7, 8 o 9% (p/p) e maggiormente preferibilmente del 7%, in cui ciascun valore è inteso contemplare opzionalmente un intervallo di $\pm 0,5\%$; e/o la glicina ha una concentrazione nell'intervallo da 10 a 500 mM, come di 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 100, 150, 250 o 500 mM, preferibilmente da 50 a 400 mM, da 75 a 300 mM, da 100 a 250 mM, per esempio di 140 o 200 mM, in cui ciascun

valore è inteso contemplare opzionalmente un intervallo di ± 5 mM; e/o il trealosio ha una concentrazione nell'intervallo da 10 a 500 mM, come di 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 100, 150, 250 o 500 mM, preferibilmente da 100 a 300 mM, da 150 a 280 mM, per esempio di 160 mM o 260 mM, in cui ciascun valore è inteso contemplare opzionalmente un intervallo di ± 5 mM.

[0111] In una forma di realizzazione preferita, le formulazioni secondo qualsiasi aspetto della descrizione sono isotoniche rispetto al sangue umano. Le soluzioni isotoniche possiedono la stessa pressione osmotica del plasma sanguigno e così possono essere infuse per via endovenosa in un soggetto senza cambiare la pressione osmotica del plasma sanguigno del soggetto. La tonicità può essere espressa in termini di osmolalità, che può essere un'osmolalità teorica, o preferibilmente un'osmolalità determinata sperimentalmente. Tipicamente, l'osmolalità sarà nell'intervallo di 290 ± 60 mOsm/kg, preferibilmente di 290 ± 20 mOsm/kg.

[0112] Quindi, nella selezione degli eccipienti (se presenti) la persona esperta considererà la concentrazione del tampone e le concentrazioni degli uno o più eccipienti e preferibilmente arriverà a una

formulazione con un'osmolalità negli intervalli come sopra specificati. La persona esperta ha familiarità con i calcoli per stimare l'osmolalità (si veda per esempio WO2010/077422). Se necessario, la persona esperta può inoltre includere un composto per regolare l'osmolalità della formulazione. Composti esemplificativi includono, ma non sono limitati a, i summenzionati eccipienti e/o uno o più tra sorbitolo, metionina, destrosio, inositolo, arginina o cloridrato di arginina.

[0113] È stato dimostrato che una formulazione comprendente saccarosio era particolarmente idonea per mantenere la stabilità fisica, durante per esempio la conservazione, o il congelamento-scongelo, dei polipeptidi. Di conseguenza, la presente descrizione si riferisce a formulazioni comprendenti circa dal 5 al 9%, più preferibilmente dal 6 all'8% e ancora più preferibilmente il 7% di saccarosio, in cui ciascun valore è inteso contemplare opzionalmente un intervallo di $\pm 0,5\%$.

[0114] Le formulazioni della descrizione possono anche comprendere composti che sono specificatamente utili per proteggere il polipeptide della descrizione durante il crioessiccamento. Tali composti sono noti anche come

lioprotettori e sono ben noti alla persona esperta. Esempi specifici includono, ma non sono limitati a, zuccheri come saccarosio, sorbitolo o trealosio; amminoacidi come glutammato, in particolare glutammato monosodico o istidina; betaina, solfato di magnesio, alcoli di zucchero, propilenglicole, polietilenglicoli e combinazioni degli stessi. Considerando la descrizione, la quantità necessaria di un tale composto da aggiungere può essere facilmente determinata dalla persona esperta in considerazione della stabilità della formulazione in forma liquida e quando sottoposta a liofilizzazione. Le formulazioni che sono particolarmente idonee per il crioessiccamento possono inoltre comprendere agenti ammassanti. Gli agenti idonei sono ampiamente noti alla persona esperta. È stato dimostrato che una formulazione comprendente saccarosio era particolarmente idonea non solo per mantenere la stabilità fisica, durante per esempio la conservazione e il congelamento-scongelo, dei leganti del vWF, ma anche come lioprotettore.

5.5.4 Detergente

[0115] In un ulteriore aspetto della descrizione, la formulazione secondo qualsiasi aspetto della descrizione può inoltre comprendere un detergente o

tensioattivo. I detergenti o tensioattivi idonei per uso con la descrizione includono, ma non sono limitati a, esteri di acidi grassi del poliossietilene sorbitano, per esempio polisorbato -20, -40, -60, -65, -80 o -85. I nomi commerciali comuni per i polisorbati includono Alkest, Canarcel e Tween. La persona esperta conosce ulteriori esempi non limitativi di detergenti, come quelli elencati per esempio in WO2010/077422. In un aspetto preferito della descrizione, il detergente è un detergente non ionico. Più specificatamente, il detergente è polisorbato-80, qui nel seguito denominato anche Tween-80. La persona esperta può facilmente determinare una concentrazione idonea del detergente per una formulazione della descrizione. Tipicamente, la concentrazione sarà la più bassa possibile, al contempo mantenendo gli effetti vantaggiosi dei detergenti, per esempio un effetto stabilizzante in condizioni di sforzo di taglio, per esempio di mescolamento, che riduce l'aggregazione dei leganti del vWF formulati. In aspetti esemplificativi non limitativi della descrizione, la concentrazione del detergente può essere nell'intervallo dallo 0,001 allo 0,5%, per esempio dello 0,001%, 0,002%, 0,003%, 0,004%, 0,005%, 0,01%, 0,015%, 0,02%, 0,025%, 0,03%, 0,035%, 0,04%,

0,045%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% o 0,5%, preferibilmente in una concentrazione tra lo 0,01 e lo 0,05%, più preferibilmente tra lo 0,01 e lo 0,02%, per esempio dello 0,01% (v/v).

5.5.5 Combinazioni

[0116] Le varie forme di realizzazione come sopra descritte nelle Sezioni dalla 5.5.1 alla 5.5.4 possono essere combinate in formulazioni della descrizione senza limitazioni. Per esempio, sono intesi essere inclusi intervalli di valori che usano una combinazione di qualsiasi dei valori sopra elencati come limiti superiori e/o inferiori. Tuttavia, esempi preferibili non limitativi di formulazioni della descrizione includono formulazioni in cui il tampone è un tampone citrato a un pH di circa 6,5, preferibilmente a una concentrazione di 20 mM, e la formulazione comprende inoltre saccarosio, preferibilmente a una concentrazione circa del 7% (p/v) e opzionalmente comprende inoltre un detergente non ionico come Tween-80, preferibilmente a una concentrazione dello 0,01% (v/v).

5.6 Ulteriore lavorazione

[0117] Come indicato, qualsiasi delle formulazioni di cui sopra può essere ulteriormente lavorata per esempio

mediante liofilizzazione, essiccamento a spruzzo o congelamento, per esempio congelamento in massa. Il prodotto lavorato risultante ha caratteristiche derivate dalla formulazione di partenza liquida, come sopra definita. Ove necessario, possono essere inclusi agenti aggiuntivi per l'ulteriore lavorazione, per esempio lioprotettori e così via.

5.6.1 Congelamento

[0118] In alcuni casi, le formulazioni contenenti leganti del vWF vengono congelate per la conservazione. Di conseguenza, è desiderabile che la formulazione sia relativamente stabile in tali condizioni, come i cicli di congelamento-scongelamento (FT, freeze-thaw). Un metodo per determinare l'idoneità di una formulazione è quello di sottoporre una formulazione campione ad almeno due, per esempio tre, quattro, cinque, otto, dieci o più cicli di congelamento (per esempio a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) e scongelamento (per esempio mediante scongelamento rapido in un bagno d'acqua a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ o scongelamento lento a da $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$), determinando il recupero di massa del prodotto originale e la presenza e/o la quantità di specie LMW e/o di specie HMW che si accumulano dopo i cicli di FT e confrontandola con la quantità di specie LMW o di

specie HMW presenti nel campione prima della procedura di FT, per esempio mediante SE-HPLC. Un aumento delle specie LMW o HMW indica una diminuzione di stabilità.

5.6.2 Liofilizzazione

[0119] Le formulazioni possono essere conservate dopo liofilizzazione. Pertanto, testare una formulazione per la stabilità del componente polipeptidico della formulazione dopo la liofilizzazione è utile per determinare l'idoneità di una formulazione. Il metodo è simile a quello descritto, supra, per il congelamento, a eccezione del fatto che la formulazione campione viene liofilizzata anziché congelata, ricostituita al suo volume originale e testata per la presenza di specie LMW e/o di specie HMW. La formulazione campione liofilizzata viene confrontata con una formulazione campione corrispondente che non era stata liofilizzata. Un aumento delle specie LMW o HMW nel campione liofilizzato rispetto al campione corrispondente indica una diminuzione di stabilità nel campione liofilizzato. In generale, un protocollo di liofilizzazione include il caricamento di un campione in un liofilizzatore o crioessiccatore, un periodo di pre-raffreddamento, congelamento, inizio del vuoto, aumento alla temperatura di essiccamento primario, essiccamento

primario, aumento alla temperatura di essiccamento secondario, essiccamento secondario e tappatura del campione. Sebbene il processo di crioessiccamento sia ben noto nella tecnica, vari fattori determinano le caratteristiche di crioessiccamento di un campione, incluse: la temperatura di transizione vetrosa (T_g') e la temperatura di collasso (T_c). Parametri aggiuntivi che possono essere selezionati per un protocollo di liofilizzazione includono vuoto (per esempio in micron) e temperatura del condensatore.

[0120] Velocità di aumento idonee per la temperatura sono tra circa 0,1 °C/minuto e 2 °C/minuto, per esempio tra 0,1 °C/minuto e 1,0 °C/minuto, tra 0,1 °C/minuto e 0,5 °C/minuto, tra 0,2 °C/minuto e 0,5 °C/minuto, di 0,1 °C/minuto, 0,2 °C/minuto, 0,3 °C/minuto, 0,4 °C/minuto, 0,5 °C/minuto, 0,6 °C/minuto, 0,7 °C/minuto, 0,8 °C/minuto, 0,9 °C/minuto e 1,0 °C/minuto. Le temperature di stoccaggio idonee durante il congelamento per un ciclo di liofilizzazione sono generalmente da circa -55 °C a -5 °C, da -25 °C a -5 °C, da -20 °C a -5 °C, da -15 °C a -5 °C, da -10 °C a -5 °C, di -10 °C, -11 °C, -12 °C, -13 °C, -14 °C, -15 °C, -16 °C, -17 °C, -18 °C, -19 °C, -20 °C, -21 °C, -22 °C, -23 °C, -24 °C o -25 °C. Le temperature di stoccaggio

possono essere diverse per l'essiccamento primario e l'essiccamento secondario, per esempio l'essiccamento primario può essere eseguito a una temperatura inferiore rispetto all'essiccamento secondario. In un esempio non limitativo, l'essiccamento primario può essere eseguito a 0 °C o in alternativa a +5 °C e l'essiccamento secondario a +25 °C. In alcuni casi, viene usato un protocollo di ricottura durante il congelamento e prima dell'inizio del vuoto. In tali casi, deve essere selezionato il tempo di ricottura e la temperatura è generalmente al di sopra della temperatura di transizione vetrosa della composizione. In generale, il tempo di ricottura è da circa 2 a 20 ore, da circa 3 a 19 ore, da circa 2 a 10 ore, da circa 3 a 5 ore, da circa 3 a 4 ore, di circa 2 ore, circa 3 ore, circa 5 ore, circa 8 ore, circa 10 ore, circa 12 ore, circa 15 ore o circa 19 ore.

[0121] La temperatura per la ricottura è generalmente da circa -35 °C a circa -5 °C, per esempio da circa -25 °C a circa -8 °C, da circa -20 °C a circa -10 °C, di circa -25 °C, circa -20 °C, circa -15 °C, circa 0 °C o circa -5 °C. In alcuni casi, la temperatura di ricottura è generalmente da -35 °C a +5 °C, per esempio da -25 °C a -8 °C, da -20 °C a -10 °C, di -25 °C, -20

°C, -15 °C, 0 °C, +5 °C.

[0122] La stabilità delle formulazioni descritte nel presente documento può essere testata usando una varietà di parametri di liofilizzazione inclusi: le temperature di stoccaggio dell'essiccamento primario da -25 °C a +30 °C e durate dell'essiccamento secondario da 2 ore a 33 ore a da 0° a +30 °C. La temperatura per l'essiccamento secondario dovrebbe essere la più alta possibile, senza causare degradazione dell'ingrediente farmaceutico attivo.

[0123] Un eccipiente da usare in una formulazione di questa invenzione dovrebbe preferibilmente soddisfare uno o più tra i seguenti parametri: essere farmacologicamente inerte; essere compatibile con i requisiti di lavorazione; essere ben tollerato dal paziente; essere non dannoso per il materiale attivo; fornire un prodotto solubile assorbibile; fornire un prodotto stabile alla conservazione; e fornire un prodotto commercialmente accettabile.

[0124] In una forma di realizzazione, la formulazione della presente invenzione viene preparata mediante crioessiccamento, per esempio come indicato nella figura 1 o nella Tabella 14.

[0125] È stato dimostrato che la liofilizzazione di

formulazioni a base di citrato/saccarosio migliora drasticamente la stabilità dei leganti del vWF. In particolare, le formulazioni a base di citrato/saccarosio essenzialmente impediscono le modifiche chimiche che si verificano nella forma liquida, ma con l'eccezione di piccole quantità di formazione di piroglutammato. Inaspettatamente, l'abbassamento della concentrazione di citrato e allo stesso tempo l'aumento della concentrazione di saccarosio miglioravano la stabilità chimica, per esempio diminuiva la formazione di piroglutammato. Il legante del vWF ha dimostrato di essere robusto dopo la liofilizzazione a estremi nella temperatura del prodotto. Infatti, il profilo di stabilità era identico per il materiale che era stato preparato usando una varietà di cicli di crioessiccamento.

[0126] In generale, un ciclo di liofilizzazione può durare da 10 ore a 100 ore, per esempio da 20 ore a 80 ore, da 30 ore a 70 ore, da 40 ore a 60 ore, da 45 ore a 50 ore, da 50 ore a 66 ore.

[0127] In un esempio non limitativo, è stata formulata in massa e liofilizzata una formulazione di citrato 20 mM, saccarosio al 7%, Tween-80 allo 0,01%, pH 6,5, a una concentrazione proteica di 12,5 mg/ml di legante

del vWF.

[0128] Esempi non limitativi dell'intervallo di temperatura per la conservazione di una formulazione dell'invenzione sono da circa -20 °C a circa +50 °C, per esempio da circa -15 °C a circa +40 °C, a circa -15 °C a circa +30 °C, da circa -15 °C a circa +20 °C, da circa +5 °C a circa +25 °C, da circa +5 °C a circa +20 °C, da circa +5 °C a circa +15 °C, da circa +2 °C a circa +12 °C, da circa +2 °C a circa +10 °C, da circa +2 °C a circa +8 °C, da circa +2 °C a circa +6 °C o di circa +2 °C, +3 °C, +4 °C, +5 °C, +6 °C, +7 °C, +8 °C, +10 °C, +15 °C, +25 °C, +30 °C o +40 °C. Nonostante le temperature di conservazione, in certi casi, i campioni sono stabili a variazioni della temperatura che possono verificarsi transitoriamente nelle condizioni di conservazione e trasporto che possono essere previste per tali composizioni.

[0129] È stato stabilito che lavorando con le formulazioni dell'invenzione come definite nelle rivendicazioni è possibile ottenere una polvere essiccata risultante che presenta una granulometria idonea per una ritenzione (retention) soddisfacente e una rapida dissoluzione del materiale attivo. La formulazione essiccata secondo l'invenzione comprende

particelle che rimangono stabili e uniformi durante l'intera lavorazione, la finitura finale, la conservazione e la distribuzione. La formulazione è stabile alla conservazione e scorrevole, non presenta problemi quando dispensata nel suo contenitore finale ed è semplice da somministrare al paziente.

5.6.3 Essiccamento a spruzzo

[0130] In alcuni casi, una formulazione viene essiccata a spruzzo e quindi conservata. L'essiccamento a spruzzo viene condotto usando metodi noti nella tecnica e può essere modificato per usare l'essiccamento a spruzzo liquido o congelato (per esempio usando metodi come quelli da Niro Inc. (Madison, WI), Upperton Particle Technologies (Nottingham, Inghilterra) o delle pubblicazioni di brevetto statunitensi nn. 2003/0072718 e 2003/0082276) o Buchi (Brinkman Instruments Inc., Westbury, NY).

5.6.4 Diluente

[0131] Le formulazioni liofilizzate come descritte nel presente documento possono essere ricostituite come necessario miscelando la forma liofilizzata con un diluente idoneo per risolubilizzare i componenti della formulazione originale a una concentrazione desiderata. Il termine "diluente" così come usato nel presente

documento si riferisce a un solvente farmaceuticamente accettabile (sicuro e non tossico per la somministrazione a un umano) per alterare od ottenere una concentrazione appropriata come descritta nel presente documento. Diluenti esemplificativi includono, ma non sono limitati a, acqua sterile (per esempio WFI, acqua Milli-Q), soluzione salina, glucosio, destrosio, soluzioni di Ringer e tampone acquose.

5.7 Composizioni farmaceutiche

[0132] Le formulazioni della presente invenzione sono preferibilmente idonee per uso in metodi di terapia del corpo animale o umano. Quindi, l'invenzione riguarda composizioni farmaceutiche o diagnostiche comprendenti una formulazione del polipeptide secondo qualsiasi aspetto dell'invenzione od ottenibili mediante qualsiasi metodo o processo dell'invenzione.

[0133] Le formulazioni dell'invenzione sono preferibilmente formulazioni farmaceutiche. In particolare, le formulazioni sono idonee per la somministrazione parenterale a un umano, per esempio somministrazione sottocutanea, endovenosa, intramuscolare, intradermica o intraperitoneale, preferibilmente somministrazione endovenosa o sottocutanea. La somministrazione contempla qualsiasi

modo per somministrare una formulazione liquida, in particolare un'iniezione. Rientrano nell'ambito della presente invenzione altre forme di somministrazione sistemica, per esempio tramite dispositivi impiantabili, pompe per microinfusione (opzionalmente impiantabili) e/o formulazioni a rilascio sostenuto (impiantabili), per esempio depositi, gel, formulazioni polimeriche biodegradabili. Le composizioni farmaceutiche sono sterili e stabili durante la fabbricazione e la conservazione, in quanto i derivati/prodotti di degradazione dei leganti del vWF sono indesiderati in un contesto clinico. La composizione sarà anche di elevata purezza, per esempio escluderà la presenza di prodotti batterici come LPS. Le formulazioni possono essere sterilizzate mediante qualsiasi mezzo idoneo, per esempio filtrazione sterile, irradiazione e combinazioni delle stesse e così via. Preferibilmente, le composizioni farmaceutiche sono adatte per la somministrazione parenterale (in particolare endovenosa, intrarteriosa o transdermica). La somministrazione endovenosa è considerata essere di particolare importanza. Preferibilmente il legante del vWF è sotto forma di una forma parenterale, maggiormente preferibilmente di

forme endovenose e sottocutanee.

[0134] Per essere idonea come una formulazione farmaceutica, la formulazione dell'invenzione tipicamente comprenderà il polipeptide della descrizione (ossia l'agente attivo) in un rapporto idoneo rispetto al volume. Per esempio, per l'iniezione sottocutanea la concentrazione di agente attivo può essere maggiore, al fine di consentire di somministrare la dose farmaceutica necessaria in un volume più piccolo, rispetto a una formulazione per iniezione endovenosa. Tuttavia, in alcune forme di realizzazione la concentrazione di agente attivo sarà identica per iniezione sottocutanea o endovenosa e potrà essere negli intervalli esemplificativi come definiti nel presente documento.

[0135] In alcune forme di realizzazione, le formulazioni dell'invenzione possono comprendere agenti aggiuntivi, per esempio agenti attivi aggiuntivi, eccipienti, stabilizzanti, conservanti come agenti antimicrobici e così via.

[0136] Le formulazioni dell'invenzione sono preferibilmente in una dose applicata a un paziente che ne necessita. Ciononostante, la particolare modalità di somministrazione e il dosaggio possono essere

selezionati dal medico curante tenendo in considerazione le particolarità del paziente, in particolare età, peso, stile di vita, livello di attività e condizione medica generale come appropriato. Più specificatamente, ALX-0081 viene somministrato per via endovenosa o per via sottocutanea in un intervallo di dosaggio di 24 ore. Ancora più preferibilmente, ALX-0081 viene somministrato per via endovenosa o per via sottocutanea in un intervallo di dosaggio di 24 ore dopo aver considerato l'attività di aggregazione, per esempio misurata mediante RIPA, (ristocetin induced platelet aggregation) aggregazione piastrinica indotta da ristocetina - (Favaloro EJ. *Clin Haematol* 2001; 14: 299-319) e/o il saggio di agglutinazione piastrinica con cofattore ristocetinico - (Howard MA, Firkin BG. Ristocetin - a new tool in the investigation of platelet aggregation. *Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica* 1971; 26: 362-9). Per esempio, non viene somministrata un'ulteriore dose se si stima che l'attività di aggregazione rimanga al di sotto del 10% misurata mediante RIPA o rimanga al di sotto del 20% misurata mediante RICO per le successive 6 ore (inibizione clinicamente rilevante).

[0137] Tuttavia, in generale il dosaggio dei leganti

del vWF può dipendere da vari fattori, come l'efficacia e la durata d'azione dell'ingrediente attivo, specie a sangue caldo e/o sesso, età, peso e condizione individuale dell'animale a sangue caldo.

[0138] Di norma il dosaggio è tale che una singola dose di un legante del vWF viene per esempio stimata in base a risultati in vitro o per esempio in base a risultati da uno studio di incremento della dose per verificare la tossicità subcronica in scimmie cinomolgo. In base a una tale serie di dati preclinici, si può determinare una dose iniziale e i successivi incrementi per un legante del vWF. Per esempio una dose può essere da 0,5 a 50 mg, in particolare da 1 a 30 mg e viene somministrata a un animale a sangue caldo che pesa approssimativamente 75 (+/-30) kg (ma può essere anche diversa da questa norma). Se desiderato, questa dose può anche essere assunta in diverse dosi parziali, opzionalmente uguali ("mg" indica mg di farmaco per mammifero - incluso umano - da trattare).

[0139] La dose sopra menzionata - somministrata come una dose singola (che è una forma di realizzazione) o in diverse dosi parziali - può essere ripetuta, come sopra menzionato, per esempio una volta ogni sei ore, una volta ogni 12 ore o una volta al giorno. In altri

termini, le composizioni farmaceutiche possono essere somministrate in regimi variabili da una terapia continua ogni 6 ore a una terapia con dosaggio a intervalli più lunghi.

[0140] Preferibilmente, i leganti del vWF vengono somministrati in dosi che sono dello stesso ordine di grandezza di quelle usate nel trattamento adiuvante in pazienti che necessitano di PCI come suggerito nel presente documento per ALX-0081. Per esempio, per i leganti del vWF preferiti contenenti 12A02H1, per esempio ALX-0081 e varianti funzionali dello stesso, si possono usare dosi di leganti del vWF nell'intervallo da circa 0,5 a circa 40 mg, preferibilmente da circa 1 a circa 35 mg, o da circa 2 a circa 30 mg, ancora più preferibilmente da circa 3 a circa 25 mg o da circa 4 a circa 20 mg, o da circa 5 a circa 17,5 mg, o perfino da circa 6 a circa 16 mg, o da circa 7,5 a circa 15 mg o perfino da circa 10 a circa 14 mg, più preferibilmente di circa 10, circa 12,5 o circa 13,8 mg per il trattamento acuto in pazienti umani.

[0141] Le formulazioni in forma di dosaggio unitario singola contengono preferibilmente da circa 0,5 a circa 40 mg, preferibilmente da circa 1 a circa 35 mg, o da circa 2 a circa 30 mg, ancora più preferibilmente da

circa 3 a circa 25 mg o da circa 4 a circa 20 mg o da circa 5 a circa 17,5 mg o perfino da circa 6 a circa 16 mg, o da circa 7,5 a circa 15 mg o perfino da circa 10 a circa 14 mg, più preferibilmente di circa 10, circa 12,5 o circa 13,8 mg e le formulazioni non in forma di dosaggio unitario singola contengono preferibilmente da circa 0,5 a circa 40 mg, preferibilmente da circa 1 a circa 35 mg, o da circa 2 a circa 30 mg, ancora più preferibilmente da circa 3 a circa 25 mg o da circa 4 a circa 20 mg, o da circa 5 a circa 17,5 mg o perfino da circa 6 a circa 16 mg o da circa 7,5 a circa 15 mg o perfino da circa 10 a circa 14 mg, più preferibilmente di circa 10, circa 12,5 o circa 13,8 mg dell'ingrediente attivo.

[0142] Le preparazioni farmaceutiche per somministrazione parenterale sono per esempio quelle in forme di dosaggio unitario, come fiale. Vengono preparate in un modo noto *per se*, per esempio mediante processi convenzionali di miscelazione, dissoluzione o liofilizzazione.

[0143] Le formulazioni parenterali sono in particolare fluidi iniettabili che sono efficaci in vari modi come in corrispondenza del sito di PCI, per via intrarteriosa, per via intramuscolare, per via

intraperitoneale, per via intranasale, per via intradermica, per via sottocutanea o preferibilmente per via endovenosa. Tali fluidi sono preferibilmente soluzioni o sospensioni acquose isotoniche che possono essere preparate prima dell'uso, per esempio da preparazioni liofilizzate o concentrate che contengono l'ingrediente attivo da solo o unitamente a un vettore farmaceuticamente accettabile. Le preparazioni farmaceutiche possono essere sterilizzate e/o contenere componenti aggiuntivi, per esempio conservanti, stabilizzanti, agenti bagnanti e/o emulsionanti, solubilizzanti, sali per regolare la pressione osmotica e/o tamponi.

[0144] Le formulazioni idonee per applicazione transdermica includono una quantità efficace dell'ingrediente attivo con un vettore. I vettori vantaggiosi includono solventi assorbibili farmacologicamente accettabili per favorire il passaggio attraverso la cute dell'ospite. Tipicamente, i dispositivi transdermici sono sotto forma di un cerotto comprendente un elemento di supporto, un serbatoio contenente il composto opzionalmente con vettori, opzionalmente una barriera di controllo della velocità per erogare l'ingrediente attivo alla cute

dell'ospite a una velocità controllata e predeterminata in un periodo di tempo prolungato e mezzi per fissare il dispositivo alla cute.

[0145] La tabella che segue fornisce alcuni esempi non limitativi di formulazioni a base di tampone citrato e fosfato della presente descrizione. Se desiderato, tutte le formulazioni possono essere regolate a un'osmolalità di 290 ± 60 mOsm/kg aggiungendo un eccipiente idoneo. Le formulazioni possono comprendere uno qualsiasi o più tra i polipeptidi della presente descrizione, per esempio le SEQ ID NO: 1-19, in particolare la SEQ ID NO: 1.

Tampone	Conc tampone (mM)	pH	Tampone	Conc tampone (mM)	pH
Citrato	10	6.0	fosfato	10	6.5
Citrato	10	6.5	fosfato	10	7.0
Citrato	10	7.0	fosfato	10	7.5
Citrato	20	6.0	fosfato	20	6.5
Citrato	20	6.5	fosfato	20	7.0
Citrato	20	7.0	fosfato	20	7.5
Citrato	30	6.0	fosfato	30	6.5
Citrato	30	6.5	fosfato	30	7.0
Citrato	30	7.0	fosfato	30	7.5
Citrato	40	6.0	fosfato	40	6.5
Citrato	40	6.5	fosfato	40	7.0
Citrato	40	7.0	fosfato	40	7.5
Citrato	50	6.0	fosfato	50	6.5
Citrato	50	6.5	fosfato	50	7.0
Citrato	50	7.0	fosfato	50	7.5

[0146] Le concentrazioni del tampone in questa tabella sono intese contemplare opzionalmente ± 5 mM. I valori di pH sono intesi contemplare opzionalmente $\pm 0,2$. Ciascuno dei tamponi di cui sopra può essere combinato con uno o più eccipienti selezionati per esempio tra NaCl a una concentrazione per esempio di 25, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 150, 250 o 500 mM; mannitolo a una concentrazione per esempio del 2, 3 o 4% (p/v); glicina a una concentrazione per esempio di 25, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 150, 250 o 500 mM; trealosio a una concentrazione per esempio di 25, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 150, 250 o 500 mM e saccarosio a una concentrazione per esempio del 4, 5, 6, 7, 8 o 9% (p/v) e/o un tensioattivo, per esempio Tween-80, a una concentrazione dello 0,001%, 0,002%, 0,003%, 0,004%, 0,005%, 0,01%, 0,015%, 0,02%, 0,025%, 0,03%, 0,035%, 0,04%, 0,045%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% o 0,5% (v/v).

5.8 Effetti dell'invenzione

[0147] L'invenzione fornisce formulazioni stabili dei leganti del vWF, per esempio i domini immunoglobulinici singoli variabili come definiti nel presente documento, per esempio le SEQ ID NO: 1-19, in particolare comprendenti la SEQ ID NO: 1. "Stabile" indica

generalmente che i domini immunoglobulinici singoli variabili non subiscono cambiamenti fisici o chimici significativi a seguito di conservazione per periodi di tempo prolungati per esempio da 1 mese a 36 mesi, anche se esposti a uno o più stress chimici o fisici come temperature elevate (pari a o maggiori di +25 °C) o stress fisico come agitazione o mescolamento. Più in particolare, "stabile" indica che a seguito di conservazione per periodi prolungati (come definiti) in condizioni (come definite) vi è solo una formazione limitata (come definita) di uno o più prodotti di degradazione, per esempio derivati a basso peso molecolare (LMW) (frammenti) dei polipeptidi della descrizione; e/o derivati o modifiche chimiche come per esempio varianti dei piroglutammato; e/o derivati ad alto peso molecolare (HMW) (oligomeri o polimeri) formati per esempio per aggregazione.

[0148] La persona esperta conosce bene le tecniche per valutare la dimensione di una proteina, per esempio cromatografia a esclusione dimensionale HPLC, o per valutare la formazione di derivati chimici, per esempio HPLC a fase inversa. La persona esperta ha anche familiarità con gli apparecchi e gli strumenti software comunemente usati per eseguire tali analisi. Per

esempio, la persona esperta conosce il software comunemente usato per analizzare le corse cromatografiche per esempio in termini di area dei picchi relativa. Esempi includono (ma non sono limitati a) il sistema per HPLC Agilent 1200 dotato di software ChemStation (Agilent Technologies, Palo Alto, USA, Rev B) o il sistema per HPLC Dionex Ultimate 3000 dotato di software Chromeleon (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA, V6.8).

[0149] Le tecniche generali che possono essere usate per valutare la stabilità di una proteina, per esempio un dominio immunoglobulinico singolo variabile, includono diffusione di luce statica, filtrazione a flusso tangenziale, spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier, dicroismo circolare, dispiegamento delle proteine indotto da urea, fluorescenza intrinseca del triptofano e/o legame della proteina con acido 1-anilino-8-naftalensolfonico. In aggiunta, la formulazione dell'invenzione presenta poca o nessuna perdita di potenza/attività biologica nel corso della conservazione e/o sotto l'influenza di uno o più stress come definiti nel presente documento. L'attività biologica e/o la potenza possono essere determinate per esempio come descritto in

WO2006/122825.

5.8.1 Stabilità termica

[0150] Le formulazioni della presente invenzione sono caratterizzate dal fatto di fornire un'elevata stabilità termica dei leganti del vWF, per esempio dei domini immunoglobulinici singoli variabili come descritti nel presente documento. La stabilità termica può essere valutata per esempio determinando la temperatura di fusione (T_m). Le tecniche idonee per determinare la temperatura di fusione sono note e includono per esempio un saggio di spostamento termico (TSA, thermal shift assay) per esempio come descritto nel presente documento. Più specificatamente, le formulazioni della presente invenzione determinano un aumento della T_m per i domini immunoglobulinici singoli variabili come determinato mediante TSA rispetto ad altre formulazioni. Questo effetto è esemplificato nella Tabella 1 della sezione sperimentale.

[0151] Come può essere accertato dalla sezione sperimentale, un'alta stabilità termica, ossia alta T_m , può essere considerata come un'indicazione di stabilità alla conservazione.

[0152] Secondo la presente invenzione, le formulazioni dell'invenzione hanno un'influenza positiva sulla T_m in

un ampio intervallo di valori di pH, per esempio tra 6,0 e 7,0 per il tampone citrato e da 6,5 a 7,5 per il tampone fosfato. L'effetto più vantaggioso sulla T_m può essere osservato per il tampone citrato a pH da 6 a 7 e in particolare per pH di $6,5 \pm 0,2$ e per il tampone fosfato a pH da 6,5 a 7,5, in particolare pH di $7,1 \pm 0,2$.

[0153] L'aggiunta di eccipienti può avere un ulteriore effetto positivo o negativo sulla T_m (Tabella 1). Per esempio, il trealosio può aumentare la T_m (nel contesto di un particolare tampone) per esempio tra 150 mM e 300 mM. Anche il mannitolo o il saccarosio avevano un evidente effetto positivo sulla T_m . Questi eccipienti possono trovare uso in particolari forme di realizzazione dell'invenzione, per esempio in formulazioni dove sono vantaggiosi un agente ammassante o lioprotettori. Queste forme di realizzazione esemplificative non precludono l'uso di ulteriori lioprotettori o agenti ammassanti noti, da soli o in combinazione con mannitolo o saccarosio.

[0154] Come evidenziato dalla sezione sperimentale di questa descrizione, la T_m come determinata mediante TSA funge da indicatore utile per la stabilità dei leganti del vWF, per esempio i domini immunoglobulinici singoli

variabili della descrizione.

5.8.2 Stabilità per quanto riguarda lo stress meccanico

[0155] Le formulazioni dell'invenzione sono caratterizzate da un'alta stabilità per quanto riguarda lo stress meccanico, come lo stress da mescolamento, agitazione o sforzo di taglio. Un saggio possibile per valutare la stabilità sotto stress meccanico è il monitoraggio del segnale di diffusione a 500 nm in uno spettrofluorometro o tramite spettrofotometria UV per esempio a 340 nm. Un aumento della diffusione o dell'assorbimento UV riflette la formazione di aggregati. Quando si formano aggregati (HMW), l'aumento nel tempo segue una curva lineare per la quale può essere determinata una pendenza (intensità di diffusione/tempo o unità di assorbanza/s). Preferibilmente, le formulazioni della presente invenzione sono caratterizzate da una pendenza minore di 0,0006, per esempio minore di 0,0005, per esempio tra 0 e 0,0004 (si vedano le figure 4A e B).

[0156] Le formulazioni comprendenti tamponi citrato sono particolarmente preferite e hanno un effetto positivo sul recupero di proteina per esempio dopo mescolamento come sopra definito. Per esempio, il recupero di massa è almeno del 90%, 95%, 98% o 100%. Il

recupero di proteina viene determinato rispetto al tenore di proteina totale prima di sottoporre il campione a stress per esempio mediante mescolamento. Le formulazioni comprendenti tamponi fosfato determinano un recupero almeno del 75%, 80%, 85% o anche più dopo mescolamento come sopra definito.

[0157] A una concentrazione esemplificativa non limitativa di 5 mg/ml, le formulazioni della descrizione formano solo aggregati reversibili in risposta a mescolamento in assenza di Tween. Quindi, le formulazioni della descrizione impediscono la formazione di aggregati irreversibili sotto stress meccanico. Di conseguenza, in un ulteriore aspetto della descrizione, le formulazioni della descrizione possono comprendere un detergente non ionico come sopra definito, per esempio Tween-80, per esempio a una concentrazione come sopra definita, per esempio tra lo 0,01% e lo 0,02% (v/v). L'aggiunta del detergente può ulteriormente migliorare la stabilità fisica della formulazione. Per esempio, a una concentrazione esemplificativa non limitativa di 5 mg/ml, l'aggiunta del detergente può impedire la formazione di aggregati (reversibili e irreversibili) come determinata per esempio monitorando il segnale di diffusione a 500 nm

in uno spettrofluorometro o mediante spettrofotometria UV (340 nm) (figure 4A e B).

[0158] La stabilità fisica delle formulazioni della presente invenzione può anche essere dimostrata mediante SE-HPLC. Le diverse formulazioni non limitative di domini immunoglobulinici singoli variabili della presente invenzione possono sopportare uno stress meccanico, per esempio stress da mescolamento, senza formare oligomeri (HMW) o prodotti di degradazione (LMW). Le formulazioni dell'invenzione rimangono stabili senza degradazione o oligomerizzazione, come determinato per esempio dopo 1,5 ore di mescolamento mediante analisi SE-HPLC.

[0159] In nessuna delle formulazioni viene rilevata oligomerizzazione o degradazione (per esempio come determinato mediante il profilo RP-HPLC (solo degradazione) o SE-HPLC). Quindi, secondo una forma di realizzazione preferita dell'invenzione, le formulazioni comprendono un tampone citrato e presentano un recupero almeno del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o perfino circa del 100%, per esempio nelle condizioni come sopra descritte, in cui il recupero viene determinato per esempio mediante RP-HPLC o SE-HPLC rispetto a un campione non stressato.

Vantaggiosamente, l'eccipiente nel contesto di un tampone citrato è saccarosio e il recupero come sopra definito è almeno dell'80%, 85%, 90%, 95%, 98% o perfino circa del 100%.

5.8.3 Prove di stabilità di formulazioni liquide

5.8.3.1 Stabilità alla conservazione

[0160] Le formulazioni liquide dell'invenzione forniscono buona stabilità quando conservate, per esempio a una temperatura di -70 °C, -20 °C, +5 °C, +25 °C o +40 °C, per esempio per da 1 a 36 mesi, come per 1, 1,5, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 o 36 mesi. I risultati più vantaggiosi possono essere ottenuti con formulazioni a base di tampone citrato come esemplificate nella Tabella 5.

[0161] La persona esperta riconoscerà inoltre che la conservazione a +25 °C e più, in particolare a +40 °C, rappresenta condizioni di conservazione stressate. Si prevede che tali condizioni aumentino e accelerino eventuali segni di instabilità, per esempio instabilità chimica o fisica. Quindi, una conservazione relativamente breve a per esempio +25 o +40 °C fornisce una buona indicazione per una stabilità alla conservazione a lungo termine in condizioni più miti (per esempio a +5 °C o congelato).

5.8.3.2 Stabilità alla conservazione in termini di recupero di proteina

[0162] Per esempio, le formulazioni della presente invenzione forniscono un recupero di proteina almeno del 95%, per esempio almeno del 96, 97, 98, 99 o perfino circa del 100% dopo conservazione a una temperatura tra -70 °C e +40 °C. Il recupero di proteina può essere determinato mediante qualsiasi mezzo noto per quantificare proteine, per esempio mediante RP-HPLC o SE-HPLC, come esemplificato nella Tabella 5 rispetto a un campione di riferimento mantenuto a -70 °C. Questi risultati possono essere osservati per esempio dopo conservazione alla temperatura indicata di 1 mese, 1,5 mesi, 3 mesi, 6 mesi, 9 mesi, 12 mesi, 18 mesi, 24 mesi, 30 mesi o perfino di 36 mesi.

5.8.3.3 Stabilità alla conservazione in termini di derivati chimici/prodotti di degradazione

[0163] Inoltre, le formulazioni della presente invenzione minimizzano la produzione di derivati chimici, per esempio varianti di piroglutammato, con dimensione del picco di meno del 5,0% come determinata per esempio mediante RP-HPLC (si veda la Tabella 5). In questo tipo di analisi, l'area di un determinato picco

viene confrontata con l'area totale del cromatogramma e a ciascun picco viene attribuita un'area relativa. La persona esperta conosce mezzi di analisi idonei, per esempio software idoneo, per analizzare i cromatogrammi (esempi specifici non limitativi includono il sistema per HPLC Agilent 1200 dotato di software ChemStation (Agilent Technologies, Palo Alto, USA, Rev B) o il sistema per HPLC Dionex Ultimate 3000 dotato di software Chromeleon (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA, V6.8). Quindi, preferibilmente, la variante di piroglutammato contribuisce a un'area dei picchi per meno del 5%, preferibilmente meno del 4,6%, per esempio del 4,5, 4,3, 4,2, 4,0 o perfino meno del 3,8% come determinato mediante RP-HPLC a seguito di conservazione a temperature tra -70 °C e +40 °C, per esempio a +40 °C, per esempio dopo conservazione per una durata come sopra definita, per esempio di 1 mese.

[0164] Le formulazioni della presente invenzione minimizzano anche l'ossidazione, come la formazione di prodotti ossidati (come determinata per esempio mediante RP-HPLC) per un periodo di conservazione come sopra definito, per esempio di 1 mese a una temperatura tra -70 °C e +40 °C (si veda la Tabella 5). Quindi, le formulazioni della presente invenzione determinano

varianti dell'ossidazione con un'area dei picchi di meno del 3%, preferibilmente meno del 2,7%, preferibilmente meno del 2,5%, per esempio meno del 2,3%, 2,2%, per esempio del 2,0 o perfino meno come dell'1,7% o 1,5% a seguito di conservazione a temperature tra -70 °C e +40 °C, per esempio di +40 °C, per esempio dopo conservazione per una durata come sopra definita, per esempio di 1 mese (come determinata per esempio mediante RP-HPLC).

5.8.3.4 Stabilità alla conservazione in termini di oligomerizzazione

[0165] Le formulazioni dell'invenzione forniscono anche stabilità alla conservazione, cosicché non si forma evidente materiale oligomerico solubile (come definito per esempio mediante SE-HPLC) a temperature di conservazione tra -70 °C e +40 °C, dopo durate di conservazione come sopra definite, per esempio di 1 mese; oppure si forma meno dell'1%, preferibilmente meno dello 0,5%, per esempio lo 0,3% di materiale oligomerico solubile (come definito per esempio mediante SE-HPLC) a temperature di conservazione tra -70 °C e +40 °C, per esempio di +40 °C, dopo durate di conservazione come sopra definite, per esempio di 1 mese.

[0166] La presente invenzione ha anche l'effetto di fornire un indice di aggregazione come determinato mediante valori di assorbanza $[(100 \times A_{340}) / (A_{280} - A_{340})]$ che rimane al di sotto di 0,15, preferibilmente al di sotto di 0,1 dopo conservazione a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$ per la conservazione di una durata come sopra definita, per esempio di 1 mese.

5.8.3.5 Stabilità alla conservazione come riflessa in recupero del prodotto principale

[0167] Le formulazioni dell'invenzione hanno l'effetto che l'area dei picchi del prodotto principale, come determinata per esempio mediante RP-HPLC (si veda la Tabella 5) è circa del 90% dopo conservazione a tra $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$ dopo una durata di conservazione come sopra indicata, per esempio di 1 mese; oppure il picco del prodotto principale, come determinato per esempio mediante RP-HPLC (si veda la Tabella 5) è almeno dell'85% o più, come dell'86%, 87% o 88%. Più preferibilmente, il picco principale è del 90%, 92% o 95%, per esempio almeno del 97%, più preferibilmente del 100% dopo conservazione a tra $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$, per esempio a $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$, dopo una durata di conservazione come sopra indicata, per esempio di 1 mese; oppure il picco del prodotto principale, come determinato per esempio

mediante SE-HPLC, è almeno dell'85%, almeno del 90%, preferibilmente almeno del 95%, per esempio almeno del 98% o perfino circa del 100% dopo conservazione a tra -70 °C e +40 °C, per esempio a +40 °C, dopo una durata di conservazione come sopra indicata, per esempio di 1 mese.

[0168] Le formulazioni secondo la presente invenzione hanno anche l'effetto che l'area di picco principale come determinata mediante RP-HPLC dopo conservazione per esempio a una concentrazione fino a 20 mg/ml a tra -70 °C e +25 °C per tra 1 e 3 mesi rimane invariata rispetto alla formulazione prima della conservazione e rappresenta almeno il 90%, più preferibilmente almeno il 95% dei picchi totali, in cui il campione di riferimento ha un picco principale per esempio del 95%. A seguito di conservazione a +40 °C per 1 mese la formulazione della presente invenzione mantiene il picco principale come determinato mediante RP-HPLC almeno dell'80%, 85% o 90%; dopo conservazione per 2 mesi almeno dell'80% o 85% e dopo conservazione per 3 mesi almeno del 75% o 80%.

[0169] Inoltre, come determinato mediante cIEF, la formulazione della presente invenzione ha l'effetto di fornire un recupero del prodotto principale dopo

conservazione a una concentrazione di per esempio fino a 20 mg/ml per tra 1 e 3 mesi a una temperatura tra -70 °C e +40 °C che è comparabile a quello del campione di riferimento (formulazione senza conservazione, il picco principale è almeno del 98%), per esempio il picco principale è almeno dell'85% o più, come dell'86%, 87% o 88%. Più preferibilmente, il picco principale è del 90%, 92% o 95%, per esempio almeno del 97%, più preferibilmente del 100% dopo conservazione a tra -70 °C e +40 °C.

5.8.3.6 Stabilità in condizioni di congelamento-scongelamento

[0170] Oltre a fornire la stabilità delle formulazioni in condizioni di conservazione che rimangono costanti nel tempo (per esempio conservazione a +5 °C) o che includono un singolo ciclo di FT (per esempio conservazione a -20 °C o -70 °C), un ulteriore effetto dell'invenzione è la stabilità in condizioni di cicli di FT ripetuti. Ciascuna transizione tra stato congelato e liquido e viceversa impone condizioni particolarmente stressanti sui domini immunoglobulinici singoli variabili.

[0171] Le formulazioni dell'invenzione hanno anche l'effetto di fornire buona stabilità in condizioni di

FT. Per esempio le formulazioni dell'invenzione possono essere sottoposte per esempio a 10 cicli di FT tra -70 °C e temperatura ambiente (per esempio +25 °C) o tra -20 °C e temperatura ambiente. I domini immunoglobulinici singoli variabili compresi nelle formulazioni sopporteranno queste condizioni senza deterioramento significativo, come accertato per esempio mediante RP-HPLC o SE-HPLC. L'effetto di cicli di FT ripetitivi su forme di realizzazione non limitative diverse di formulazioni dell'invenzione è stato valutato e rivela che in tutti i casi è stata preservata l'integrità chimica e fisica dei leganti del vWF, per esempio dei domini immunoglobulinici singoli variabili. Il recupero complessivo era nell'intervallo tra il 95 e il 100%, preferibilmente almeno del 95, 98 o 99%. La percentuale relativa dei diversi picchi rimaneva invariata rispetto a un controllo sottoposto a un solo ciclo di FT.

[0172] Più specificamente, a una concentrazione tra 5 mg/ml e 20 mg/ml, 10 cicli di FT determinavano un recupero (come determinato in base per esempio all'area totale dei picchi, ossia l'AU del polipeptide, come determinato mediante RP-HPLC o SE-HPLC, che è almeno del 90%, 95%, 98% o 100%; in cui in una particolare

forma di realizzazione il profilo RP-HPLC o SE-HPLC era invariato rispetto a un campione di riferimento (1 ciclo di FT).

5.8.3.7 Stabilità in termini di potenza

[0173] La persona esperta conosce vari modi per determinare la potenza di leganti del vWF, in particolare di domini immunoglobulinici singoli variabili, più specificatamente dei polipeptidi secondo una qualsiasi tra le SEQ ID NO: 1-19, per esempio la SEQ ID NO: 1 (si veda, per esempio, la sezione sperimentale di WO2006/122825, per esempio gli Esempi da 3 a 6, 18 e 19, o la sezione sperimentale di WO2009/115614).

[0174] In una forma di realizzazione, la potenza del polipeptide della presente descrizione può essere determinata in base al legame al suo antigene mediante un saggio convenzionale, per esempio ELISA, Biacore, RIA, FACS e così via.

[0175] La potenza dei leganti del vWF rimaneva accettabile nelle formulazioni dell'invenzione come testata in condizioni stressate, ossia 4 settimane di conservazione a +40 °C.

5.8.3.8 Stabilità in termini di compatibilità

[0176] Le formulazioni della presente invenzione sono

compatibili anche con una gamma di diluenti diversi. Per esempio, le formulazioni possono essere miscelate/diluite con tali diluenti, senza influire sulla stabilità chimica e fisica dei domini immunoglobulinici singoli variabili.

[0177] Quindi, le formulazioni della presente invenzione forniscono anche stabilità in un ampio intervallo di concentrazioni, come definite nel presente documento.

5.8.3.9 Sommario degli effetti stabilizzanti

[0178] Le formulazioni della presente invenzione hanno l'effetto di mantenere l'integrità chimica e fisica dei polipeptidi della presente descrizione anche dopo conservazione prolungata, per esempio per durate come sopra definite, a temperature tra -70 °C e +25 °C.

[0179] La conservazione dei domini immunoglobulinici singoli variabili come definiti nel presente documento, in particolare ALX-0081, a -70 °C per 1 mese, non influiva sulle loro caratteristiche fisicochimiche per nessuna delle formulazioni dell'invenzione, in particolare degli esempi non limitativi di tamponi testati nella sezione sperimentale. La conservazione non aveva un effetto significativo sui profili RP-HPLC, SE-HPLC o cIEF.

5.8.4 Prove di stabilità di formulazioni liofilizzate

[0180] In aggiunta, l'invenzione fornisce formulazioni stabili dei leganti del vWF, per esempio dei domini immunoglobulinici singoli variabili come definiti nel presente documento, per esempio le SEQ ID NO: 1-19, preferibilmente compresa la SEQ ID NO: 1, che sono particolarmente utili per la liofilizzazione. Le formulazioni dell'invenzione determinavano solubilità migliorata e stabilità migliorata alla conservazione dopo liofilizzazione.

5.8.4.1 Stabilità alla conservazione

[0181] Le formulazioni dell'invenzione possono fornire buona stabilità dopo liofilizzazione quando conservate, per esempio a una temperatura di -70 °C, -20 °C, +5 °C, +25 °C o +40 °C, per esempio per da 1 a 36 mesi, come per 1, 1,5, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 o 36 mesi. I risultati più vantaggiosi possono essere ottenuti con formulazioni a base di tampone citrato, per esempio le formulazioni 3 e 7 come esemplificate nella sezione sperimentale (per esempio buona formazione di torta e nessun segno visivo di decadimento, figura 6). La persona esperta può riconoscere che nella discussione nel seguito i valori preferiti riflettono composizioni di tampone citrato, per esempio come esemplificate

nella Tabella 8.

[0182] La persona esperta riconoscerà anche che la conservazione a +25 °C, e più in particolare a +40 °C, rappresenta condizioni di conservazione stressate. Si prevede che tali condizioni aumentino o accelerino eventuali segni di instabilità, per esempio instabilità chimica o fisica. Quindi, una conservazione relativamente breve per esempio a +25 °C o +40 °C fornisce una buona indicazione per una stabilità alla conservazione estesa in condizioni più miti (per esempio +5 °C o congelato).

5.8.4.2 Stabilità alla conservazione in termini di recupero di proteina

[0183] Per esempio, le formulazioni della presente invenzione forniscono un recupero di proteina dopo liofilizzazione almeno del 95%, per esempio almeno del 96, 97, 98, 99 o perfino circa del 100% dopo conservazione a una temperatura tra -70 °C e +40 °C. Il recupero di proteina può essere determinato mediante qualsiasi mezzo noto per quantificare proteine, per esempio in base al tenore, mediante RP-HPLC o SE-HPLC. Questi risultati possono essere osservati per esempio dopo conservazione alla temperatura indicata per da 1 a 36 mesi, come di 1, 1,5, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 o 36

mesi.

5.8.4.3 Stabilità alla conservazione in termini di derivati chimici / prodotti di degradazione

[0184] Inoltre, le formulazioni della presente invenzione possono impedire o minimizzare la produzione di derivati chimici dopo liofilizzazione, come confermato per esempio mediante SE-HPLC.

5.8.4.4 Stabilità alla conservazione in termini di oligomerizzazione

[0185] Le formulazioni dell'invenzione possono anche fornire stabilità alla conservazione dopo liofilizzazione, cosicché non si forma evidente materiale oligomerico solubile (come definito per esempio mediante SE-HPLC) a temperature di conservazione tra -70 °C e +40 °C, dopo durate di conservazione come sopra definite, per esempio di 1 mese; oppure si forma meno dell'1%, preferibilmente meno dello 0,5%, per esempio lo 0,3% di materiale oligomerico solubile (come definito per esempio mediante SE-HPLC) a temperature di conservazione tra -70 °C e +40 °C, per esempio di +40 °C, dopo durate di conservazione come sopra definite, per esempio da 1 a 36 mesi, come di 1, 1,5, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 o 36 mesi.

5.8.4.5 Stabilità alla conservazione come riflessa in recupero del prodotto principale

[0186] Le formulazioni dell'invenzione possono anche avere l'effetto che dopo liofilizzazione il picco del prodotto principale, come determinato per esempio mediante SE-HPLC (si veda la Tabella 18 e le Tabelle dalla 27 alla 29), è circa del 100% dopo conservazione a tra -70 °C e +40 °C dopo una durata di conservazione come sopra indicata, per esempio di 1, 3, 6, 9, 12, 18 o 24 mesi; oppure il picco del prodotto principale, come determinato per esempio mediante SE-HPLC (si veda la Tabella 18 e le Tabelle dalla 27 alla 29), è almeno dell'85% o più, come dell'86%, 87% o 88%. Più preferibilmente, il picco principale è del 90%, 92% o 95%, per esempio almeno del 97%, più preferibilmente del 100% dopo conservazione a tra -70 °C e +40 °C, per esempio a +25 °C dopo una durata di conservazione come sopra indicata, per esempio di 1, 3, 6, 9, 12, 18 o 24 mesi; oppure il picco del prodotto principale, come determinato per esempio mediante SE-HPLC, è almeno dell'85%, almeno del 90%, preferibilmente almeno del 95%, per esempio almeno del 98% o perfino circa del 100% dopo conservazione a tra -70 °C e +40 °C, per esempio a +40 °C, dopo una durata di conservazione come

sopra indicata, per esempio di 1, 3, 6, 9, 12, 18 o 24 mesi.

[0187] Le formulazioni secondo la presente invenzione hanno anche l'effetto che dopo liofilizzazione il picco principale come determinato mediante RP-HPLC dopo conservazione per esempio a una concentrazione di 12,5 mg/ml a tra -70 °C e +40 °C per tra 1 e 12 mesi rimane invariato rispetto a quello della formulazione prima della conservazione e rappresenta almeno il 90%, più preferibilmente almeno il 93% dei picchi totali, in cui il campione di riferimento ha un picco principale per esempio del 93% (si veda la Tabella 15). A seguito di conservazione dopo liofilizzazione a +40 °C per fino a 12 mesi la formulazione della presente invenzione mantiene il picco principale come determinato mediante RP-HPLC almeno del 91%, 92% o 93%.

[0188] Inoltre, come determinato mediante cIEF (si vedano le Tabelle dalla 27 alla 29), le formulazioni della presente invenzione hanno l'effetto di fornire un recupero dopo liofilizzazione del prodotto principale dopo conservazione a una concentrazione per esempio di 12,7 mg/ml per tra 1 e 24 mesi a una temperatura tra -70 °C e +40 °C che è comparabile a quello del campione di riferimento (formulazione senza conservazione, il

picco principale è almeno del 96%), per esempio il picco principale è almeno dell'85% o più, come dell'86%, 87% o 88%. Più preferibilmente, il picco principale è del 90%, 92%, 93%, 94%, 95% o 96%, per esempio almeno del 97%, più preferibilmente del 100% dopo conservazione a tra -70 °C e +40 °C.

5.8.4.6 Stabilità in condizioni di congelamento-scongelamento

[0189] Le formulazioni dell'invenzione hanno anche l'effetto di fornire buona stabilità dopo liofilizzazione in condizioni di FT. Per esempio le formulazioni dell'invenzione possono essere sottoposte per esempio a 5 cicli di FT a tra -20 °C e temperatura ambiente (per esempio +25 °C). I domini immunoglobulinici singoli variabili compresi nelle formulazioni supporteranno queste condizioni senza deterioramento significativo, come accertato per esempio mediante RP-HPLC o SE-HPLC. In tutti i casi è stata preservata l'integrità chimica e fisica dei leganti del vWF, per esempio dei domini immunoglobulinici singoli variabili. Il recupero complessivo era nell'intervallo tra il 95 e il 100%, preferibilmente almeno del 95, 98 o 99% rispetto a un campione di controllo liquido conservato a -70 °C.

[0190] Più specificatamente, a una concentrazione di 16 mg/ml, 5 cicli di FT determinavano un recupero (come determinato in base per esempio all'area totale, ossia l'AU) del polipeptide, come determinato mediante RP-HPLC o SE-HPLC, che è almeno del 90%, 95%, 98%, 99% o 100%; in cui in una forma di realizzazione particolare il profilo RP-HPLC o SE-HPLC era invariato rispetto a un campione di riferimento (campione di controllo liquido conservato a -70 °C) (si veda la Tabella 12).

5.8.4.7 Stabilità in termini di potenza

[0191] La persona esperta conosce vari modi per determinare la potenza di leganti del vWF, in particolare di domini immunoglobulinici singoli variabili, più specificatamente dei polipeptidi secondo una qualsiasi tra le SEQ ID NO: 1-19, per esempio la SEQ ID NO: 1 (si veda, per esempio, la sezione sperimentale di WO2006/122825, per esempio gli Esempi da 3 a 6, 18 e 19, o la sezione sperimentale di WO2009/115614). La potenza dei leganti del vWF dopo liofilizzazione non era influenzata dopo cicli di FT ripetuti nelle formulazioni. In particolare, la potenza dei leganti del vWF rimaneva stabile nelle formulazioni dell'invenzione come testate in condizioni stressate, ossia fino a 12 mesi di conservazione a +40 °C (Tabella

23) e perfino fino a 24 mesi di conservazione a +40 °C (Tabella 29). In una forma di realizzazione, la potenza del polipeptide della presente descrizione dopo liofilizzazione può essere determinata in base al legame al suo antigene mediante un saggio convenzionale, per esempio ELISA, Biacore, RIA, FACS e così via. Più specificatamente, nelle formulazioni della presente invenzione almeno l'80%, preferibilmente almeno il 90%, più preferibilmente almeno il 95% o perfino almeno il 99% del legante del vWF mantiene la sua attività di legame dopo conservazione nelle condizioni di stress di cui sopra rispetto all'attività di legame prima della conservazione.

[0192] In un ulteriore aspetto, le formulazioni della presente invenzione non presentano quasi alcuna perdita di attività biologica quando si confronta la formulazione liquida di ALX-0081 con la formulazione liofilizzata, come valutato mediante vari saggi immunologici, inclusi, ma non limitati a, saggio Biacore, saggio immunoassorbente legato a un enzima (ELISA), saggio di attività del cofattore indotta da ristocetina (RICO) e/o saggio basato su Gyrolab (si veda la Sezione 7.13 e la Tabella 24).

5.8.4.8 Sommario degli effetti stabilizzanti

[0193] Le formulazioni della presente invenzione hanno l'effetto dopo liofilizzazione di mantenere l'integrità chimica e fisica dei polipeptidi della presente descrizione, in particolare ALX-0081, ossia perfino dopo conservazione prolungata, per esempio per durate come sopra definite, a temperature tra -70 °C e +40 °C, il profilo di purezza/impurezza del prodotto essenzialmente non cambia. Per esempio, la conservazione prolungata dopo liofilizzazione non aveva un effetto significativo sui profili RP-HPLC, SE-HPLC o cIEF come supportato dalla sezione sperimentale.

5.9 Metodi dell'invenzione

[0194] I leganti del vWF della descrizione possono essere prodotti mediante qualsiasi metodo comunemente usato. Esempi tipici includono l'espressione ricombinante in sistemi ospite idonei, per esempio batteri o lievito. I leganti del vWF saranno sottoposti a un regime di purificazione idoneo prima di essere formulati secondo la presente invenzione.

[0195] La presente invenzione contempla metodi per produrre le formulazioni come definite nelle rivendicazioni.

[0196] Le fasi di purificazione e formulazione possono coincidere, per esempio quando i leganti del vWF

dell'invenzione vengono eluiti da una colonna usando un tampone secondo la presente descrizione. In alternativa, le formulazioni dell'invenzione possono essere preparate scambiando un tampone mediante qualsiasi mezzo idoneo, per esempio mezzi ampiamente usati nella tecnica come dializzazione, ultrafiltrazione e così via.

[0197] In alcune forme di realizzazione il metodo per produrre una formulazione dell'invenzione può anche riferirsi alla ricostituzione di una formulazione liofilizzata o essicata a spruzzo, per esempio mediante aggiunta di acqua o di un tampone idoneo (che può opzionalmente comprendere ulteriori eccipienti).

[0198] I metodi per preparare una formulazione secondo la presente invenzione possono contemplare ulteriori fasi, come versarla in flaconi idonei per uso clinico, come contenitori sigillati, e/o confezionarla in una forma di dosaggio unitario. I metodi possono anche comprendere ulteriori fasi come essiccamento a spruzzo, liofilizzazione o congelamento, per esempio congelamento in massa. L'invenzione contempla anche i contenitori, forme di dosaggio unitario o altri prodotti ottenibili mediante qualsiasi dei metodi come definiti nelle rivendicazioni.

[0199] Le formulazioni della presente invenzione possono essere usate per conservare i leganti del vWF, per esempio gli ISVD come definiti nel presente documento. Quindi, la descrizione contempla un metodo per conservare un legante del vWF come usato nel presente documento, caratterizzato dall'uso di una formulazione come definita nel presente documento. Più specificatamente, la descrizione contempla metodi per stabilizzare un legante del vWF come definito nel presente documento per la conservazione, comprendenti per esempio la preparazione di una formulazione come descritta nel presente documento. La conservazione può essere per da 1 a 36 mesi, come per 1, 1,5, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 o 36 mesi, per esempio per almeno 12 o perfino 24 mesi, opzionalmente a una temperatura tra -70 °C e +40 °C, come di -70 °C, -20 °C, +5 °C, +25 °C o +40 °C, preferibilmente a una temperatura tra -70 °C e +25 °C, più preferibilmente a una temperatura tra -20 °C e +5 °C. Quindi, la conservazione può contemplare congelamento, crioessiccamento (liofilizzazione) e/o essiccamento a spruzzo. I metodi di conservazione possono inoltre comprendere la valutazione dell'integrità fisica e chimica dei leganti del vWF come definiti nel presente documento.

[0200] La presente descrizione si riferisce anche a metodi per analizzare formulazioni comprendenti almeno uno dei leganti del vWF come definiti nel presente documento. Le formulazioni possono essere analizzate per eventuali segni di instabilità chimica o fisica dei leganti del vWF come definiti nel presente documento. Per esempio, le formulazioni possono essere valutate per la presenza di prodotti di degradazione, per esempio derivati a basso peso molecolare come frammenti proteolitici; e/o per derivati chimici, per esempio varianti di piroglutammato; e/o per derivati ad alto peso molecolare come aggregati, agglomerati e così via. La formulazione può anche essere valutata per il tenore di proteina totale e/o la potenza. Ciascuno dei vari metodi di saggio a cui viene fatto riferimento nel presente documento può essere usato nel metodo di analisi della presente descrizione.

[0201] Quindi, la presente descrizione si riferisce anche a un metodo per monitorare e/o valutare la qualità e/o la stabilità di una formulazione, per esempio durante uno o più tra fabbricazione, conservazione e uso. La descrizione si riferisce anche a un metodo per il controllo di qualità di una formulazione, per esempio per valutare che la

formulazione soddisfi le specifiche di prodotto come ulteriormente descritto nel presente documento. La descrizione in qualsiasi di questi aspetti comprende uno o più selezionati tra il confronto con uno o più campioni di riferimento, l'analisi della variazione tra lotti e il monitoraggio continuo di un processo di produzione.

[0202] La presente invenzione si riferisce a qualsiasi prodotto che è associato alle formulazioni della presente invenzione, per esempio comprendendoli, o essendo necessario per la loro produzione o il loro confezionamento, senza alcuna limitazione.

[0203] Per esempio, la presente invenzione si riferisce a un articolo di fabbricazione, per esempio un contenitore sigillato comprendente una o più delle formulazioni secondo la presente invenzione. L'invenzione si riferisce anche a una forma farmaceutica di dosaggio unitario, per esempio una forma di dosaggio idonea per la somministrazione parenterale a un paziente, preferibilmente un paziente umano, comprendente una o più delle formulazioni secondo qualsiasi forma di realizzazione descritta nel presente documento. La forma di dosaggio unitario può essere per esempio nel formato di una siringa

preriempta, una fiala, una cartuccia o un flacone. La siringa, la fiala, la cartuccia o il flacone può essere fabbricato con qualsiasi materiale idoneo, come vetro o plastica, e può includere materiali di gomma, come tappi di gomma per flaconi e stantuffi di gomma, e guarnizioni di gomma per siringhe e cartucce. L'invenzione si riferisce anche a un kit comprendente una o più delle formulazioni secondo la presente invenzione. Il kit può inoltre comprendere istruzioni per l'uso e/o un foglio illustrativo clinico.

[0204] In qualsiasi forma di realizzazione dei prodotti come definiti nel presente documento, l'invenzione contempla anche la presenza di materiale di confezionamento, istruzioni per l'uso e/o fogli illustrativi clinici, per esempio come richiesto da aspetti regolatori.

5.10 Definizioni

5.10.1 Identità

[0205] Al fine di confrontare due o più sequenze amminoacidiche, la percentuale di "*identità di sequenza*" tra una prima sequenza amminoacidica e una seconda sequenza amminoacidica (nel presente documento denominata anche "*identità amminoacidica*") può essere calcolata dividendo [*il numero di residui amminoacidici*

nella prima sequenza amminoacidica che sono identici ai residui amminoacidici nelle posizioni corrispondenti nella seconda sequenza amminoacidica] per [il numero totale di residui amminoacidici nella prima sequenza amminoacidica] e moltiplicando per [100%], in cui ciascuna delezione, inserzione, sostituzione o addizione di un residuo amminoacidico nella seconda sequenza amminoacidica - rispetto alla prima sequenza amminoacidica - è considerata come una differenza in un singolo residuo amminoacidico (posizione), ossia come una "differenza amminoacidica" come definita nel presente documento.

[0206] In alternativa, il grado di identità di sequenza tra due o più sequenze amminoacidiche può essere calcolato usando un algoritmo per computer noto per l'allineamento di sequenze come NCBI Blast v2.0 usando impostazioni standard.

[0207] Alcune altre tecniche, algoritmi per computer e impostazioni per determinare il grado di identità di sequenza sono descritti per esempio in WO04/037999, EP0967284, EP1085089, WO00/55318, WO00/78972, WO98/49185 e GB2357768-A.

[0208] Solitamente, al fine di determinare la percentuale di "identità di sequenza" tra due sequenze

amminoacidiche secondo il metodo di calcolo sopra indicato nel presente documento, la sequenza amminoacidica con il maggior numero di residui amminoacidici sarà considerata come la "prima" sequenza amminoacidica e l'altra sequenza amminoacidica sarà considerata come la "seconda" sequenza amminoacidica.

[0209] Inoltre, nel determinare il grado di identità di sequenza tra due sequenze amminoacidiche, la persona esperta può tenere in considerazione le cosiddette sostituzioni amminoacidiche "conservative", che possono essere generalmente descritte come sostituzioni amminoacidiche in cui un residuo amminoacidico è sostituito con un altro residuo amminoacidico con struttura chimica simile e che ha poca o essenzialmente nessuna influenza sulla funzione, sull'attività o su altre proprietà biologiche del polipeptide. Tali sostituzioni amminoacidiche conservative sono ben note nella tecnica, per esempio da WO04/037999, GB2357768-A, WO98/49185, WO00/46383 e WO01/09300; e tipi e/o combinazioni (preferiti) di tali sostituzioni possono essere selezionati in base agli insegnamenti pertinenti da WO04/037999 nonché da WO98/49185 e dagli ulteriori riferimenti ivi citati. Tali sostituzioni conservative preferibilmente sono sostituzioni in cui un amminoacido

all'interno dei seguenti gruppi da (a) a (e) è sostituito da un altro residuo amminoacidico all'interno dello stesso gruppo: (a) piccoli residui alifatici, non polari o leggermente polari: Ala, Ser, Thr, Pro e Gly; (b) residui polari, con carica negativa e loro ammidi (senza carica): Asp, Asn, Glu e Gln; (c) residui polari, con carica positiva: His, Arg e Lys; (d) grandi residui alifatici, non polari: Met, Leu, Ile, Val e Cys; ed (e) residui aromatici: Phe, Tyr e Trp. Sostituzioni conservative particolarmente preferite sono le seguenti: Ala in Gly o in Ser; Arg in Lys; Asn in Gln o in His; Asp in Glu; Cys in Ser; Gln in Asn; Glu in Asp; Gly in Ala o in Pro; His in Asn o in Gln; Ile in Leu o in Val; Leu in Ile o in Val; Lys in Arg, in Gln o in Glu; Met in Leu, in Tyr o in Ile; Phe in Met, in Leu o in Tyr; Ser in Thr; Thr in Ser; Trp in Tyr; Tyr in Trp; e/o Phe in Val, in Ile o in Leu. Qualsiasi sostituzione amminoacidica applicata ai polipeptidi descritti nel presente documento può basarsi anche sull'analisi delle frequenze delle variazioni amminoacidiche tra proteine omologhe di specie diverse sviluppata da Schulz et al., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, 1978, sulle analisi dei potenziali formanti la struttura sviluppate

da Chou e Fasman, *Biochemistry* 13: 211, 1974 e *Adv. Enzymol.*, 47: 45-149, 1978, e sull'analisi dei motivi di idrofobicità nelle proteine sviluppata da Eisenberg et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 140-144, 1984; Kyte & Doolittle; *J Molec. Biol.* 157: 105-132, 1981 e Goldman et al., *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 15: 321-353, 1986. Informazioni sulla struttura primaria, secondaria e terziaria di Nanobodies® sono fornite nella descrizione nel presente documento e nella tecnica nota generale sopra citata. Inoltre, a questo scopo, la struttura cristallina di un dominio V_{HH} da un lama è per esempio fornita da Desmyter et al., *Nature Structural Biology*, Vol. 3, 9, 803 (1996); Spinelli et al., *Nature Structural Biology* (1996); 3, 752-757; e Decanniere et al., *Structure*, Vol. 7, 4, 361 (1999). Si possono trovare ulteriori informazioni in merito ad alcuni dei residui amminoacidici che nei domini V_H convenzionali formano l'interfaccia V_H/V_L e alle potenziali sostituzioni camelizzanti su queste posizioni nella tecnica nota sopra citata.

6. Abbreviazioni

[0210]

API Ingrediente farmaceutico attivo

cIEF Focalizzazione isoelettrica capillare

DLS Diffusione dinamica della luce

DOE Disegno degli esperimenti

DP Prodotto farmaceutico

DS Sostanza farmaceutica

FT Congelamento-scongelamento

HMW Alto peso molecolare

LMW Basso peso molecolare

MALS Diffusione della luce multi-angolo

RH Umidità relativa

RPC Cromatografia a fase inversa

RP-HPLC Cromatografia liquida ad alte prestazioni a fase inversa

SE-HPLC Cromatografia liquida ad alte prestazioni a esclusione dimensionale

SOP Procedura operativa standard

T_m Temperatura di fusione (°C)

TSA Saggio di spostamento termico

vWF Fattore di von Willebrand

WFI Acqua per iniettabili

[0211] L'invenzione sarà ora ulteriormente descritta mediante gli aspetti non limitativi preferiti, gli esempi e le figure che seguono:

7. ESEMPI

[0212] È stata progettata una serie di esperimenti al

fine di ottenere un tampone di formulazione migliorato, inteso a soddisfare un'ampia gamma di obiettivi diversi e apparentemente incongrui. In particolare, nel presente documento sono fornite formulazioni esemplificative che sono in grado di mantenere la stabilità, l'attività biologica, la purezza e la qualità di ALX-0081, e questo per un periodo di tempo esteso, stabile a vari stress come congelamento, liofilizzazione, calore e/o ricostituzione.

[0213] ALX-0081 DS contemporaneo è stato presentato sotto forma di una formulazione liquida contenente 5 mg/ml dell'ingrediente farmaceutico attivo (API) in un tampone a base di fosfato (D-PBS) contenente glicina 200 mM e Tween-80 allo 0,02% (v/v), pH 7,1 (DS). Sebbene sia stata applicata durante le sperimentazioni cliniche iniziali, questa formulazione può essere migliorata in diversi modi. Innanzitutto la concentrazione relativamente bassa richiederebbe probabilmente iniezioni sottocutanee multiple (ipotizzando che il volume per l'iniezione sottocutanea sia limitato a circa 1 ml) in tal modo riducendo la facilità d'uso per il paziente. Secondariamente, la stabilità alla conservazione a da 3 a 8 °C o a temperatura ambiente dell'attuale formulazione di ALX-

0081 è limitata. La durata di vita limitata nella presente formulazione è principalmente determinata da modifica chimica (si veda la sezione 7.2). Le modifiche chimica possono essere collegate a perdita di potenza. Sebbene si possa ottenere una durata di vita praticabile conservando il prodotto a -20 °C, tuttavia questa non è considerata essere un'opzione favorevole per la maggior parte degli scopi pratici.

7.1 Metodi

[0214] I campioni sono stati analizzati essenzialmente secondo procedure operative standard per valutare tenore, potenza e purezza, precipitazione, concentrazione, degradazione, aggregazione e potenza. In aggiunta, tutti i campioni sono stati ispezionati visivamente per la torbidità o la presenza di aggregati proteici o la precipitazione. Il tenore di umidità residua di campioni liofilizzati specifici è stato determinato mediante titolazione di Karl-Fischer.

[0215] Nel presente studio sono stati usati tre diversi programmi di liofilizzazione per crioessicare ALX-0081 - una corsa standard di 65 ore (figura 1), una corsa accorciata di 37 ore e un ciclo di liofilizzazione più lungo di 66 ore ottimizzato per ridurre il tenore di umidità residua come descritto nella Tabella 14.

[0216] In breve, all'inizio del processo di liofilizzazione accorciato di 37 ore, la temperatura di stoccaggio era di +20 °C ed è stata portata a -50 °C in 2 ore. Poi, è stato creato un vuoto di 0,04 mbar in 1 ora. Dopo aver raggiunto il vuoto di 0,04 mbar la temperatura di stoccaggio è stata mantenuta a -50 °C per 4 ore. Dopo queste 4 ore la temperatura è stata gradualmente aumentata fino a 0 °C in 15 ore (ossia fase di essiccamento primario, rimozione dell'acqua congelata). La temperatura di stoccaggio di 0 °C è stata mantenuta per 7 ore al contempo mantenendo un vuoto di 0,04 mbar. Dopo 7 ore la temperatura è stata aumentata a +25 °C in 3 ore e successivamente mantenuta a 25 °C per 5 ore (ossia fase di essiccamento secondario, rimozione dell'acqua scongelata). I flaconi sono stati chiusi sotto un vuoto di $\pm 0,400$ mbar dopodiché è stata ripristinata la pressione normale.

[0217] Lo stesso metodo è stato applicato per la corsa standard di 65 ore e differisce solo nella seconda fase di essiccamento che è stata prolungata con 28 ore a +25 °C sotto vuoto determinando un tempo di ciclo totale di circa 65 ore. Nella figura 1 è mostrata una rappresentazione schematica delle diverse fasi nella corsa di liofilizzazione standard di 65 ore. Durante il

processo di liofilizzazione, è stata monitorata la temperatura del prodotto di tre flaconi in posizioni strategiche. Infine, la corsa standard di 65 ore è stata modificata durante la corsa secondo la lettura delle sonde di temperatura determinando cicli di liofilizzazione prolungati come descritto nella Tabella 14.

7.2 Stabilità chimica della formulazione di ALX-0081 contemporanea

[0218] La RP-HPLC è uno dei metodi più informativi per valutare la stabilità chimica di una sostanza farmaceutica (DS, drug substance).

[0219] La RP-HPLC risolveva l'ALX-0081 DS in un numero di specie diverse. In aggiunta al picco principale, si potevano distinguere pre-picchi (sostanza che eluiva prima del materiale immodificato intatto) e un numero di post-picchi. Nei lotti prodotti fino a questo punto, i pre-picchi e il post-picco 1 rappresentavano in modo costante rispettivamente circa il 2% e il 3,6% della DS, mentre gli altri post-picchi rappresentavano meno dell'1% della DS.

[0220] Tuttavia, durante la conservazione in condizioni accelerate (+5 °C) o stressate (+25 °C e +37 °C/+40 °C), la relativa abbondanza di certe varianti correlate

al prodotto aumentava con il tempo e la temperatura, come raffigurato nella figura 2A. In aggiunta, il picco principale della RP-HPLC sembra dividersi in varie specie diverse a seguito di incubazione prolungata, in particolare a temperature elevate ($\geq +25$ °C) (figura 2B). I dati indicano che durante la conservazione vengono generate alcune nuove specie molecolari che eluiscono prima.

[0221] Le modifiche più importanti che erano presenti in ALX-0081 DS al momento della fabbricazione o che sono sorte durante la conservazione sono le seguenti: (i) pre-picco 1 (ossidazione); (ii) post-picco 1 (variante nor-leu); (iii) post-picco 2 (formazione di piroglutammato) e (iv) divisione del picco principale (isomerizzazione). Le modifiche (i), (ii) e (iii) non influivano significativamente sulla potenza (dati non mostrati). Al contrario, è stato dimostrato che l'isomerizzazione dei residui di acido aspartico in corrispondenza delle posizioni 105 e 236 della SEQ ID NO: 1, che si trovano nella regione CDR3, è il meccanismo molecolare predominante alla base di una potenziale perdita di potenza di ALX-0081 (si veda (iv) di cui sopra).

[0222] Si sono potute rilevare mediante cIEF anche

alcune delle varianti correlate al prodotto ALX-0081, presenti al momento della fabbricazione o sorte durante la conservazione. Ciò è avvenuto per la modifica del piroglutammato che compariva come un post-picco (si veda (iii) di cui sopra). Inoltre, analogamente a quanto è stato osservato nell'analisi RP-HPLC, gli eventi di isomerizzazione in corrispondenza della posizione 105 in entrambi i domini 12A02H1 determinavano un allargamento del picco principale e infine divisione del picco CIEF principale (si veda (iv) di cui sopra).

7.3 Screening di tamponi ed eccipienti

[0223] Al fine di sviluppare ulteriormente la formulazione di leganti del vWF, è stata progettata una serie complessa di esperimenti elaborando vari parametri che si influenzano tutti l'un l'altro, inclusi (i) tamponi diversi, (ii) a concentrazioni diverse, (iii) ciascun tampone a vari pH; e (iv) ciascuno combinato con eccipienti diversi.

[0224] I sistemi tampone dovrebbero avere una capacità di tamponamento più bassa possibile, così da non disturbare significativamente il sistema di tampone del corpo quando iniettati. In aggiunta, devono essere valutati molto attentamente il tipo e la concentrazione

del tampone in base all'attività dell'ingrediente farmaceutico attivo (API).

[0225] Generalmente, livelli aumentati di stabilità della proteina sono attribuiti a temperature di fusione elevate. Di conseguenza, sono state monitorate le proprietà termiche di ALX-0081 in presenza di varie composizioni. In particolare, è stato eseguito un esperimento di TSA in 192 formulazioni isotoniche diverse, i cui risultati sono stati introdotti in una progettazione di esperimenti (DOE, design of experiments) per valutare l'effetto di tampone, concentrazione, forza ionica, pH ed eccipienti sulla stabilità termica di ALX-0081. Il risultato era la temperatura di fusione (T_m) di ALX-0081, che è indicativa della stabilità termica della proteina nelle varie composizioni testate.

[0226] In breve, il saggio di spostamento termico (TSA) impiegato segue i cambiamenti del segnale di un colorante fluorescente, come Sypro Orange, mentre la proteina subisce un dispiegamento termico. Quando viene aggiunto a una soluzione di proteina appropriatamente ripiegata, Sypro Orange non può legarsi ad alcuna superficie sulla proteina e il suo segnale di fluorescenza si estingue. Quando la temperatura

- mM
- mannitolo intervallo di concentrazione da 0 a 270 mM
- saccarosio intervallo di concentrazione da 0 a 270 mM
- trealosio intervallo di concentrazione da 0 a 270 mM

[0228] Le temperature di fusione (T_m) ottenute sono state importate nel programma Design Expert per l'analisi dell'esperimento di screening fattoriale per predire 50 formulazioni che determinano la stabilità termica più elevata (si veda la Tabella 1).

[01229] I valori di T_m più elevati sono stati predetti per fosfato (pH da 7,0 a 7,5) e citrato (pH da 6,2 a 7,0) contenenti trealosio, saccarosio, mannitolo o glicina. Del tutto inaspettatamente, i risultati dello studio suggeriscono che i tamponi a base di Tris-HCl (pH da 7,8 a 8,0) e istidina-HCl (pH 6,5) restituiscono temperature di fusione significativamente più basse, sebbene fossero stati precedentemente eletti come sistema tampone di scelta per controllare il pH della soluzione di domini immunoglobulinici singoli variabili come descritti in WO2010/077422.

[0230] Di conseguenza, si è concluso che le formulazioni di fosfato e citrato contenenti trealosio, saccarosio, glicina o mannitolo avevano prestazioni particolarmente buone nella stabilizzazione di leganti del vWF, per esempio ALX-0081.

7.4 Prova di solubilità

[0231] Al fine di valutare se la solubilità di ALX-0081 potesse essere ulteriormente migliorata si è eseguito uno screening iniziale in diverse formulazioni. Si è scambiato il tampone di ALX-0081 con la formulazione di interesse (escluso Tween-80) e lo si è ulteriormente concentrato in una cella di agitazione (per esempio di tipo Amicon) dotata di un filtro con cut-off di 5 kDa. Non appena si verificava precipitazione o torbidità visibile, il campione veniva filtrato e veniva misurata la concentrazione di proteina. La Tabella 2 mostra un sommario dei risultati ottenuti.

[0232] La concentrazione in tamponi a base di fosfato e istidina determinava torbidità del campione e formazione di precipitazione a concentrazioni della proteina relativamente basse (<10 mg/ml). Al contrario, ALX-0081 rimaneva fisicamente stabile in tampone citrato, anche dopo aver raggiunto una concentrazione di ~56 mg/ml. In aggiunta all'ispezione visiva,

l'assenza di particolato o di specie HMW è stata confermata mediante microscopia a fluorescenza (colorazione con Rosso nilo, mediante SE-HPLC e DLS). Inoltre, sottoporre la soluzione di ~56 mg/ml a 10 cicli di FT a -20 °C o -70 °C o la conservazione a +4 °C per circa 1 settimana non sembrava influenzare la stabilità fisica della molecola come evidenziato mediante analisi SE-HPLC (si vedano rispettivamente le figure 3A e 3B).

[0233] La solubilità comparativamente elevata di ALX-0081 nel tampone citrato è stata convalidata mediante un saggio di precipitazione di PEG (dati non mostrati).

7.5 Tween-80

[0234] Al fine di determinare se il polisorbato tensioattivo non ionico, denominato anche Tween, (Polioossietilene (N) sorbitano monolaurato; in cui N=20, 40, 60, 65, 80 o 85) sia necessario nella formulazione di ALX-0081, si sono eseguiti diversi esperimenti di stress da mescolamento in tampone citrato 50 mM a pH 6,0 e 6,5. L'effetto di concentrazioni diverse di Tween-80 (nessun Tween-80 vs. 0,01% vs. 0,02% (v/v)) sulla stabilità fisica di ALX-0081 è stata valutata a 5 mg/ml monitorando un segnale di diffusione a 500 nm in uno spettrofluorometro.

[0235] Tween-80 impediva un aumento del segnale di diffusione in entrambi i tamponi dimostrando il suo effetto protettivo (figure 4A e 4B). Non sono state osservate differenze significative tra campioni contenenti Tween-80 allo 0,01% o allo 0,02% (v/v). Inoltre, i profili SE-HPLC dei campioni prima e dopo mescolamento non mostravano alcuna differenza: è stato ottenuto un recupero dal 95 al 100% e non è stato possibile rilevare alcuna oligomerizzazione o degradazione.

[0236] In base a questi risultati, è stato deciso di includere Tween-80 allo 0,01% (v/v) nella formulazione di leganti del vWF, per esempio ALX-0081.

7.6 Tween

[0237] Al fine di determinare se gli altri elementi nella serie dei polisorbati, che differiscono per la lunghezza della catena poliossietilenica e la porzione di estere di acido grasso, per esempio Tween-20, Tween-40, Tween-60, Tween-65 e Tween-85, siano necessari nella formulazione di leganti anti-vWF, vengono eseguiti diversi esperimenti di stress da mescolamento in tampone citrato 50 mM a pH 6,0 e 6,5, essenzialmente come descritto nella Sezione 7.5 di cui sopra. L'effetto di concentrazioni diverse dei vari elementi

di Tween (nessun Tween vs. 0,01% vs. 0,02% (v/v)) sulla stabilità fisica del legante del vWF viene valutato a 5 mg/ml monitorando il segnale di diffusione a 500 nm in un spettrofluorometro.

[0238] Tween-20, Tween-40, Tween-60, Tween-65 e Tween-85 danno sostanzialmente lo stesso risultato vantaggioso del Tween-80.

7.7 Prove di stabilità di formulazioni liquide

[0239] È stato eseguito uno studio più completo per valutare la stabilità di ALX-0081 in formulazioni isotoniche a base di citrato diverse a una concentrazione di 20 mg/ml. La Tabella 3 fornisce un riepilogo delle diverse formulazioni che sono state testate.

[0240] L'obiettivo principale era quello di valutare l'effetto del pH (6,0-6,5-7,0) e del tipo di eccipiente (NaCl, mannitolo, saccarosio o glicina) sulla stabilità del prodotto liquido. Per scopi di controllo e confronto diretto lo studio includeva anche ALX-0081 contemporaneo formulato a 5 mg/ml in D-PBS e glicina (identico all'attuale formulazione, a eccezione della concentrazione di Tween-80 più bassa) nonché le diverse soluzioni di ALX-0081 isotoniche a base di citrato precedentemente menzionate ma formulate a una

concentrazione di 5 mg/ml anziché di 20 mg/ml. Complessivamente, questo ha determinato 17 diverse formulazioni liquide (formulazioni n. 1-17) che sono state sottoposte a studi di stabilità approfonditi. Al fine di escludere l'effetto di differenze nella concentrazione di Tween, tutte le formulazioni contenevano Tween-80 allo 0,01% (v/v).

7.7.1 Stabilità al congelamento-scongelamento

[0241] È stato valutato l'effetto di cicli di FT ripetuti sulla stabilità di ALX-0081 sotto forma di una formulazione liquida. Aliquote delle diverse formulazioni (0,5 ml/provetta) sono state sottoposte a fino a 10 cicli di FT a -70 °C o -20 °C. Un ciclo includeva congelamento per ±20 minuti seguito da scongelamento della durata di 5 minuti in un bagno d'acqua a +25 °C. Dopo questo trattamento, tutte le formulazioni rimanevano visivamente trasparenti. Le analisi RP-HPLC mostravano un buon recupero (dal 95 al 100%) e non poteva essere rilevata alcuna differenza significativa nel profilo suggerendo che la qualità dei leganti del vWF, per esempio ALX-0081, non è influenzata dal congelamento-scongelamento ripetuto nelle 17 formulazioni liquide diverse testate.

7.7.2 Stabilità alla conservazione

[0242] La stabilità delle 17 formulazioni diverse è stata valutata anche conservando aliquote (0,5 ml/provetta) in condizioni stressate, ossia a +40 °C; la condizione di conservazione a lungo termine a -70 °C era inclusa come riferimento. Le analisi si sono focalizzate sulla RP-HPLC in quanto questo metodo è generalmente noto come un metodo particolarmente informativo per rilevare modifiche chimiche che si verificano durante la conservazione (si veda la Tabella 4). Questa sezione fornisce un riepilogo dei dati ottenuti dopo 1 mese di conservazione; i risultati confermano i riscontri ai precedenti punti temporali, ossia dopo 1 settimana e 2 settimane.

(a) RP-HPLC

[0243] Come precedentemente indicato nella Sezione 7.2 di cui sopra, l'analisi RP-HPLC risolveva ALX-0081 DS contemporaneo (formulazione con D-PBS/glicina) in alcune varianti e impurezze correlate al prodotto. In breve, in condizioni stressate (per esempio +40 °C), la purezza (% del picco principale) diminuiva in concomitanza con un aumento di alcuni dei pre/post-picchi esistenti nonché con la formazione di altri aggiuntivi.

[0244] I dati RP-HPLC ottenuti nel presente studio sono

riepilogati nella Tabella 5.

[0245] Complessivamente, i risultati ottenuti indicavano che nei diversi tamponi citrato si verificavano essenzialmente le stesse modifiche osservate nel presente tampone di formulazione (ossia D-PBS/glicina), sebbene potessero essere osservate alcune differenze nell'area dei picchi relativa. In particolare, l'aumento dell'area dei pre-picchi (ossidazione) era più lento nelle formulazioni di citrato (in particolare a pH 6,0) rispetto alla formulazione di D-PBS/glicina. Rispetto a questa formazione di pre-picchi, la glicina sembrava essere il meno favorevole tra i diversi eccipienti. Il profilo dei diversi post-picchi dopo conservazione per 1 mese a +40 °C era comparabile per tutte le formulazioni, sebbene il secondo post picco (ossia la variante di piroglutammato) sembrasse essere più pronunciato a pH 7,0 che a pH da 6,0 a 6,5. L'entità dell'allargamento/divisione del picco principale - il risultato dell'isomerizzazione dell'asp - è difficile da quantificare a causa di scarsa risoluzione; la percentuale dell'area dei picchi di spalla (shoulder peak) non poteva essere stimata accuratamente e pertanto veniva inclusa nell'area superficiale relativa

riportata nella Tabella 5 per il picco principale. Ciononostante, i cromatogrammi RP-HPLC corrispondenti (dati non mostrati) consentivano di fare una valutazione qualitativa; questi dati suggeriscono che l'entità dell'isomerizzazione è piuttosto simile nelle varie formulazioni.

(b) cIEF

[0246] Analogamente alla RP-HPLC, il metodo cIEF consente la rivelazione di certe varianti di prodotto che si verificano durante la conservazione in condizioni stressate (si veda la Sezione 7.2 per dettagli). Ciò è esemplificato nella figura 5, che confronta gli elettroferogrammi di ALX-0081 contemporaneo dopo conservazione durante un mese a -70 °C e +40 °C.

[0247] I dati cIEF ottenuti nel presente studio (dati non mostrati) fondamentalmente confermano le conclusioni raggiunte mediante l'analisi RP-HPLC, ossia nei diversi tamponi citrato si verifica lo stesso tipo di modifiche pressappoco della stessa entità osservato nel presente tampone di formulazione, rappresentato nel presente documento dalla formulazione 17 come raffigurata nella figura 5 (ossia D-PBS/glicina). Tuttavia, si sono potute osservare alcune differenze

nell'area dei picchi relativa. In particolare, il post-picco (ossia la variante di piroglutamato) sembrava essere più pronunciato a pH 7,0 che a pH da 6,0 a 6,5, il che concorda con i riscontri mediante RP-HPLC come precedentemente riepilogati nella Tabella 5.

(c) SE-HPLC

[0248] È stata eseguita l'analisi SE-HPLC per esaminare la stabilità fisica di ALX-0081, ossia per rivelare specie HMW e/o prodotti di degradazione che potrebbero essersi formati durante la conservazione in condizioni stressate. Per tutte le formulazioni che sono state qui testate, la prova di stress non sembrava avere un effetto significativo sui cromatogrammi SE-HPLC.

(d) Conclusione

[0249] Nella Tabella 5 è mostrato un sommario dei riscontri più importanti in merito alla stabilità alla conservazione delle diverse formulazioni liquide di ALX-0081. Sono stati elencati solo i dati maggiormente informativi in base all'analisi RP-HPLC. Questi dati suggeriscono una stabilità chimica più alta nel citrato 50 mM a pH da 6,0 a 6,5. A eccezione della glicina, il tipo di eccipiente non aveva un effetto significativo sulla stabilità. Rispetto alla stabilità fisica, non si sono potute osservare differenze tra le diverse

formulazioni. Quest'ultimo fatto era evidenziato dal recupero di $\pm 100\%$ osservato per tutti i campioni nelle varie analisi HPLC nonché dai cromatogrammi SE-HPLC che dimostravano l'assenza di aggregazione/degradazione.

[0250] In base ai risultati di cui sopra, è stato deciso di esplorare ulteriormente il potenziale delle formulazioni di citrato/saccarosio a pH da 6,0 a 6,5.

7.8 Prove di stabilità di formulazioni liofilizzate

[0251] È stato valutato l'effetto della liofilizzazione confrontando la stabilità alla conservazione di ALX-0081 in formulazioni liquide e liofilizzate di citrato/saccarosio (20 mg/ml di API a pH da 6,0 a 6,5). Nella Tabella 6 è fornito un riepilogo delle formulazioni testate. La formulazione a base di D-PBS/glicina della tecnica nota (5 mg/ml di API) è stata inclusa a titolo di confronto. ALX-0081 liquido (ossia prima della liofilizzazione) e liofilizzato è stato mantenuto congelato ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ per i campioni liquidi e $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per le formulazioni liofilizzate) nonché a $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$, e i campioni sono stati analizzati dopo 2 settimane e 1,5 mesi di conservazione.

[0252] Il Pannello A della figura 6 mostra un'immagine dei flaconi dopo il processo di liofilizzazione che usava la corsa standard di 65 ore come raffigurata

nella figura 1. La liofilizzazione delle formulazioni contenenti citrato/saccarosio determinava buona formazione di torta, mentre i campioni formulati in D-PBS/glicina non producevano una torta appropriata. Tutti i campioni potevano essere facilmente risolubilizzati con acqua Milli-Q e le soluzioni erano trasparenti e incolori (figura 6, pannello B).

7.8.1 Valutazione del prodotto prima e dopo liofilizzazione

[0253] L'analisi RP-HPLC e SE-HPLC non ha rilevato differenze significative in termini di caratteristiche fisicochimiche tra il prodotto di partenza liquido (mantenuto a ≤ -70 °C) e il prodotto dopo liofilizzazione e ricostituzione per alcuna delle formulazioni testate. Inoltre, è stato dimostrato il recupero completo del campione per tutte le formulazioni (Tabella 7).

7.8.2 Valutazione del prodotto liofilizzato dopo 1,5 mesi di conservazione

(a) Ispezione visiva e tenore

[0254] La torta dei campioni liofilizzati non presentava segni visivi di decadimento dopo 1,5 mesi di conservazione a -20 °C, $+5$ °C, $+25$ °C o $+40$ °C.

[0255] I campioni erano trasparenti e incolori dopo

ricostituzione con acqua Milli-Q. Inoltre, la conservazione non aveva un effetto significativo sul tenore, misurato dopo ricostituzione (Tabella 8).

(b) RP-HPLC

[0256] I profili delle 3 diverse formulazioni liofilizzate (n. 3, 7 e 17) sono stati confrontati dopo 1,5 mesi di conservazione rispettivamente a -20 °C, +5 °C, +25 °C e +40 °C. Un confronto alle condizioni più difficili (+40 °C) rileva al meglio l'impatto della liofilizzazione sulla stabilità chimica. I risultati corrispondenti sono riepilogati nella Tabella 8. Come si può vedere, la conservazione nella forma congelata non sembra influire su ALX-0081 in alcuna delle formulazioni testate nel presente studio.

[0257] Complessivamente, la conclusione prevalente dai dati ottenuti è che la liofilizzazione di una formulazione a base di citrato/saccarosio essenzialmente impedisce le modifiche chimiche che si verificano nella forma liquida, a eccezione di alcune quantità minori di modifica a piroglutammato. In queste formulazioni liofilizzate, non vi era né un aumento della percentuale dell'area dei pre-picchi, né un segno di allargamento/divisione del picco principale. Al contrario, la liofilizzazione della formulazione a base

di D-PBS/glicina non determinava un miglioramento significativo della stabilità chimica. La formazione di piroglutammato nella formulazione liofilizzata di citrato/saccarosio sembrava essere leggermente più pronunciata a pH 6,0 che a pH 6,5. Ciò è comprovato dai dati a +25 °C, alla quale temperatura la velocità di formazione di piroglutammato è più bassa, ma mostra la stessa dipendenza dal pH. Come atteso, la conservazione per fino a 1,5 mesi a -20 °C o +5 °C non causava alcun deterioramento rilevabile di ALX-0081 liofilizzato (dati non mostrati).

[0258] Sorprendentemente, a +40 °C si otteneva una stabilità migliorata nelle formulazioni a base di citrato/saccarosio rispetto alla formulazione a base di D-PBS/glicina, quest'ultima mostrando una suscettibilità significativamente più alta a modifiche chimiche.

[0259] Per le formulazioni liquide, la conservazione fino a 1,5 mesi a -70 °C, +5 °C e +25 °C non aveva un effetto significativo su ALX-0081 (dati non mostrati). Il deterioramento osservato dopo 1,5 mesi di conservazione a +40 °C concorda pressappoco con le osservazioni precedenti (si veda la Sezione 7.7.2).

(c) CIEF

[0260] I risultati ottenuti mediante analisi cIEF concordano con quelli della RP-HPLC. Soprattutto, la liofilizzazione di una formulazione a base di citrato/saccarosio non è in grado di impedire completamente la modifica a piroglutammato. Invece, la conservazione del prodotto liofilizzato a +40 °C per 1,5 mesi determinava un aumento del post-picco. Anche in questo caso, si osservava una formazione più rapida di piroglutammato in citrato/saccarosio a pH 6,0 che a pH 6,5.

(d) SE-HPLC/MALS/DLS

[0261] La conservazione per fino a 1,5 mesi a -70 °C/-20 °C, +5 °C e +25 °C non aveva effetto sui profili SE-HPLC di formulazioni liofilizzate o liquide di ALX-0081 (dati non mostrati). Tuttavia, a +40 °C si poteva osservare un allargamento del picco e formazione di picchi di spalla in tutte le formulazioni liquide. L'analisi MALS mostrava che questi picchi di spalla corrispondono ad ALX-0081 monomero (dati non mostrati). I dati suggeriscono un cambiamento conformazionale in una sottopopolazione di ALX-0081 come conseguenza della conservazione stressata. Sorprendentemente, il profilo SE-HPLC di formulazioni di citrato/saccarosio liofilizzate non era influenzato

dalla prova di stress a +40 °C, indicando che queste formulazioni liofilizzate migliorano anche la stabilità fisica di ALX-0081. Ciò tuttavia non avveniva con la formulazione di D-PBS/glicina liofilizzata; sottoporre a stress questa formulazione a +40 °C non solo determinava un picco di spalla, ma apparentemente anche alcune specie a peso molecolare più alto, visibili come un ampio pre-picco (Tabella 8). L'analisi DLS non rilevava grandi specie oligomeriche in alcuna delle formulazioni (dati non mostrati).

(e) Conclusione

[0262] Nella Tabella 8 è mostrato un sommario dei riscontri più importanti in merito alla stabilità alla conservazione delle formulazioni liofilizzate di ALX-0081 testate. Complessivamente, sono state osservate solo differenze di stabilità limitate tra le formulazioni di citrato/saccarosio, sebbene inaspettatamente ALX-0081 apparisse essere meno incline alla formazione di piroglutammato a pH 6,5 che a pH 6,0. Pertanto, l'ulteriore lavoro di riformulazione per ALX-0081 si è focalizzato su formulazioni a base di citrato/saccarosio a pH 6,5.

7.9 Ulteriore ottimizzazione della formulazione a base di citrato/saccarosio

[0263] I dati raccolti finora mostrano che una formulazione a base di citrato/saccarosio migliora la solubilità e che la liofilizzazione di questa formulazione migliora drasticamente la stabilità alla conservazione di ALX-0081. Tuttavia, la conservazione di ALX-0081 liofilizzato a temperature più alte, sebbene limitate, continua a determinare formazione di piroglutammato. È ragionevole ipotizzare che questa modifica possa limitare la durata di vita del prodotto liofilizzato (anche quando conservato a +5 °C). Rimane da chiarire il motivo per cui la liofilizzazione non era in grado di impedire questa modifica.

[0264] È stato ipotizzato che l'acqua rimanente nel prodotto crioessiccato giochi un ruolo chiave.

[0265] Se questa ipotesi fosse vera, allora l'acqua rimanente potrebbe essere minimizzata ottimizzando i parametri fisici della liofilizzazione, come tempo di essiccamento, temperatura, vuoto e così via, come sopra elencati, ma allo stesso tempo gli altri parametri del legante del vWF dovrebbero rimanere costanti. Un altro approccio consiste nel modificare la formulazione, ma anche in questo caso allo stesso tempo gli altri parametri del legante del vWF dovrebbero rimanere costanti. In aggiunta, potrebbe essere usata la

regolazione dei parametri fisici della liofilizzazione in combinazione con la modifica della formulazione.

7.9.1 Ottimizzazione dei parametri di liofilizzazione

[0266] L'ottimizzazione dei parametri fisici della liofilizzazione, inclusi (i) tempi di essiccamento, (ii) temperature delle diverse fasi, (iii) vuoto e una combinazione di da (i) a (iii) non era soddisfacente, ossia nessun effetto o effetto inadeguato sul tenore di umidità residua o influenza sui parametri dei leganti del vWF.

7.9.2 Ottimizzazione della formulazione per la liofilizzazione

[0267] L'effetto del tenore di umidità sulla stabilità chimica del prodotto liofilizzato è stato investigato regolando le concentrazioni del tampone citrato e dell'eccipiente saccarosio. In aggiunta, è stato investigato un tempo di essiccamento secondario durante il programma di liofilizzazione.

7.10 Effetto del tenore di umidità sulla stabilità del prodotto liofilizzato

[0268] Tre diverse formulazioni isotoniche di ALX-0081 con concentrazioni variabili di citrato e saccarosio (tutte e tre a pH 6,5) sono state sottoposte a due diversi programmi di liofilizzazione: da un lato la

corsa standard di 65 ore e dall'altro lato una corsa accorciata di 37 ore. Nella Tabella 9 è fornito un riepilogo delle formulazioni testate. La figura 7 mostra i flaconi ottenuti dopo liofilizzazione. La liofilizzazione determinava buona formazione di torta per tutte le formulazioni.

[0269] Campioni liofilizzati di ALX-0081 sono stati analizzati dopo 2 e 4 settimane di conservazione sia a -20 °C sia a +40 °C. Nel presente esperimento, è stato deciso di eseguire una prova esaustiva in modo da comprovare ulteriormente l'utilità delle formulazioni.

[0270] Innanzitutto, durante la conservazione a +40 °C per fino a 4 settimane, la torta dei campioni liofilizzati rimaneva intatta e la ricostituzione consentiva di ottenere soluzioni trasparenti. Il ciclo di liofilizzazione sembrava non avere alcun effetto significativo sul tenore (misurato spettrofotometricamente a 277 nm) o sull'osmolalità. In accordo con esperimenti precedenti, 4 settimane di conservazione a +40 °C non avevano un effetto sulla stabilità fisica di ALX-0081, in base ad analisi SE-HPLC, MALS e DLS (dati non mostrati). In aggiunta, è stato riscontrato che la potenza di ALX-0081 come determinata mediante il saggio basato su Biacore non

era influenzata dal processo di liofilizzazione e dalla successiva conservazione (dati non mostrati). Tuttavia, le analisi RP-HPLC hanno dimostrato che la conservazione anche in questo caso determinava la formazione - seppur minore - di quantità della variante di piroglutammato. Questa era leggermente più pronunciata per la formulazione contenente la concentrazione più alta di citrato e la concentrazione più bassa di saccarosio (Tabella 10). In aggiunta, per ciascuna formulazione liofilizzata, è stato determinato il tenore di umidità totale mediante titolazione di Karl Fisher. Nella Tabella 10 è mostrato un sommario di questi dati unitamente alla quantità di piroglutammato rilevata nei campioni stressati corrispondenti. Dai dati ottenuti per ciascun programma di liofilizzazione separatamente sembra che un tenore più alto di umidità determini una suscettibilità più alta alla formazione di piroglutammato. Ciò suggerisce che l'acqua residua presente nel prodotto liofilizzato favorisca modifiche chimiche.

[0271] In conclusione, i risultati indicano che la riduzione del tenore di umidità di leganti del vWF liofilizzati, per esempio ALX-0081, è vantaggiosa per la loro stabilità chimica.

7.11 Effetto della riduzione della forza del tampone e dell'aumento del tenore di saccarosio

[0272] I dati ottenuti nella sezione precedente mostrano che ridurre la concentrazione di citrato aumentando al contempo la concentrazione di saccarosio (in tal modo mantenendo una soluzione isotonica) è vantaggioso per la stabilità del prodotto liofilizzato. Allo stesso tempo, si è ottenuta evidenza che ALX-0081 richiedeva una concentrazione sufficientemente alta di citrato per ottenere una solubilità migliorata. Pertanto è stato deciso di valutare l'effetto delle concentrazioni di citrato e saccarosio sull'aspetto della soluzione durante conservazione a +5 °C e +25 °C e di rivalutare la stabilità al congelamento-scongelo in presenza di concentrazioni più basse di citrato.

7.11.1 Valutazione dell'impatto della concentrazione di citrato/saccarosio

[0273] In un primo esperimento, 12 formulazioni diverse di ALX-0081 sono state conservate a +5 °C e +25 °C per fino a 4 giorni. I campioni sono stati ispezionati su base regolare per torbidità o presenza di precipitato. Le immagini prese dei campioni dopo 4 giorni di conservazione sono mostrate nelle figure 8 e 9. Nella

Tabella 11 è presentato un riepilogo delle diverse formulazioni e dei risultati corrispondenti. Dopo 4 giorni di conservazione a +25 °C tutti i campioni rimanevano trasparenti e incolori (figura 8, pannello A). Al contrario, a +5 °C la maggior parte delle formulazioni di citrato senza eccipienti diventava opaca (figura 8, pannello B). Chiaramente, il grado di opacità è inversamente proporzionale alla concentrazione di citrato, la formulazione di citrato 50 mM rimanendo trasparente. Inoltre, il recupero del campione per il campione contenente citrato 15 mM era del 68% (riferito ad A277 dopo 20 ore di conservazione), mentre altri recuperi variavano dal 90 al 100% (dati non mostrati). L'aggiunta di saccarosio alla formulazione di citrato 15 mM impediva l'opacità del campione, sebbene alla concentrazione più bassa di saccarosio (ossia il 5%) venisse rilevata una certa torbidità minore a +5 °C (figura 9, pannello B).

[0274] Le osservazioni confermano l'importanza di una concentrazione sufficientemente alta di citrato nel mantenere ALX-0081 solubile, in particolare a bassa temperatura. Ciononostante, l'aumento della concentrazione di citrato determinava un aumento del tenore di umidità. Inaspettatamente, la riduzione della

concentrazione di citrato può essere compensata dall'aggiunta di saccarosio. Non è stato osservato alcun effetto di Tween-80 sulla solubilità.

7.11.2 Valutazione della stabilità a FT

[0275] Un esperimento di follow-up si è focalizzato sulla stabilità a FT di diverse formulazioni a base di citrato/saccarosio. Nove formulazioni diverse di ALX-0081 sono state sottoposte a 5 cicli di FT consecutivi a -20 °C. Nella Tabella 12 è mostrato un riepilogo delle formulazioni testate e dei risultati corrispondenti. Tutti i campioni rimanevano trasparenti e i cicli di FT non influivano la stabilità fisica dei leganti del vWF, per esempio ALX-0081, in base all'analisi del tenore e ai dati SE-HPLC.

7.11.3 Ottimizzazione della concentrazione di saccarosio e citrato in considerazione dell'isotonicità

[0276] In base ai risultati sopra menzionati di conservazione e FT è stata selezionata la concentrazione ottimale del tampone citrato di 20 mM. È stato eseguito un esperimento finale su tre formulazioni che differivano nella concentrazione di saccarosio. Lo scopo di questo esperimento era quello di stabilire la concentrazione ottimale di saccarosio per ottenere una formula isotonica e di confermare la

stabilità a FT di ALX-0081 a 20 mg/ml. In aggiunta a 5 cicli consecutivi di FT, ciascuna formulazione è stata anche sottoposta a un ciclo di FT seguito da conservazione per 24 ore a +25 °C e da un ciclo aggiuntivo di FT al fine di mimare le fasi di manipolazione durante la fabbricazione.

[0277] Nella Tabella 13 è fornito un sommario dei risultati. Tutte le formulazioni testate erano trasparenti e le varie manipolazioni non avevano un effetto sul tenore/recupero o sull'osmolalità. In base ai valori di osmolalità sembra che una concentrazione di saccarosio al 7% sia ottimale per ottenere una soluzione isotonica.

7.12 Studio di stabilità di formulazioni liofilizzate di ALX-0081 conservate a varie temperature per fino a 12 mesi

[0278] ALX-0081 formulato a 12,5 mg/ml in tampone citrato 20 mM pH 6,5, saccarosio al 7% (p/v) e Tween-80 allo 0,01% (v/v) è stato liofilizzato secondo le condizioni riportate nella Tabella 14. I campioni sono stati successivamente conservati a -20 °C (± 5 °C), +5 °C (± 3 °C), +25 °C (± 2 °C/60 \pm 5% RH) e +40 °C (± 2 °C/75 \pm 5% RH).

[0279] La stabilità delle formulazioni liofilizzate è

stata valutata a diversi punti temporali, ossia iniziale, 1 mese, 3 mesi, 6 mesi, 9 mesi e 12 mesi ed è stata valutata per purezza, aspetto, proprietà fisicochimiche e potenza.

Nelle Tabelle dalla 15 alla 23 sono forniti dati dettagliati di caratterizzazione dei campioni.

La purezza dei campioni è stata valutata mediante RP-HPLC in cui è stata determinata la percentuale dell'area media dei picchi nonché la percentuale della aree pre- e post-picchi. La concentrazione di proteina è stata determinata mediante assorbanza UV.

Inoltre, i campioni liofilizzati sono stati ispezionati visivamente, ricostituiti e la formulazione ricostituita è stata ispezionata visivamente. È stato misurato il pH dei campioni dopo ricostituzione ed è stato determinato il tenore di umidità della polvere liofilizzata mediante titolazione colorimetrica (Karl Fischer). Sono state eseguite misurazioni di conteggio del particolato per contare le particelle $\geq 10 \mu\text{m}$ e $\geq 25 \mu\text{m}$. I campioni sono stati ulteriormente caratterizzati per la funzione biologica usando un saggio basato su Biacore. La potenza è stata espressa come percentuale di potenza relativa del materiale di riferimento.

[0280] I dati di stabilità ottenuti mostrano che le

caratteristiche del prodotto ALX-0081 liofilizzato non sono influenzate significativamente da 12 mesi di conservazione a -20 °C o +5 °C. Si è riscontrato che i dati raccolti nell'intero studio di stabilità a tali temperature sono comparabili a quelli generati al tempo zero.

[0281] Sono stati osservati diversi cambiamenti minori per i campioni conservati a +25 °C o +40 °C, che possono essere attribuiti alle condizioni di conservazione accelerate o stressate. Le osservazioni principali erano:

- A +25 °C e a +40 °C è stato osservato un aumento del post-picco 2 su RP-HPLC durante la conservazione a 12 mesi, corrispondente alla formazione della variante di piroglutammato rispettivamente dallo 0,7% all'1,1% o al 2,4%.

- A +40 °C è stato notato un aumento del tenore di umidità dallo 0,7% al 2,1% (p/p) dopo 12 mesi di conservazione. Ciò poteva potenzialmente essere attribuito all'assorbimento di umidità dall'ambiente di conservazione (ossia 75% RH) da parte del tappo con la successiva diffusione graduale al prodotto.

[0282] I risultati ottenuti in condizioni stressate suggeriscono una correlazione tra il tenore di umidità

e la stabilità chimica del prodotto; ciò corrisponde ai dati riportati precedentemente nella Sezione 7.10.

Quindi, questi dati indicano l'importanza di controllare il tenore di umidità del prodotto DP durante la conservazione.

Considerando che la conservazione a +40 °C può essere ritenuta predittiva della stabilità a lungo termine a +25 °C, i dati di stabilità a 12 mesi inclusi nel presente documento forniscono una buona indicazione per la stabilità alla conservazione a lungo termine a temperatura ambiente (come per 18, 24, 30 o 36 mesi) e perfino per stabilità prolungate quando conservato in condizioni più miti (per esempio +5 °C o congelato).

7.13 Studio di comparabilità *in vitro* sull'attività biologica della formulazione di prodotto farmaceutico liquida e liofilizzata del Nanobody anti-vWF caplacizumab (ALX-0081)

7.13.1 Scopo

[0283] È stato usato un numero di saggi per valutare la comparabilità *in vitro* di ALX-0081 DP contemporaneo [formulazione liquida contenente 5 mg/ml dell'ingrediente farmaceutico attivo (API, active pharmaceutical ingredient) in un tampone a base di fosfato (D-PBS) contenente glicina 200 mM e Tween-80

allo 0,02% (v/v), pH 7,1] e la formulazione liofilizzata di ALX-0081 DP come sopra presentata [formulata a 12,5 mg/ml in tampone citrato 20 mM pH 6,5, saccarosio al 7% (p/v) e Tween-80 allo 0,01% (v/v)] per quanto riguarda l'attività biologica e il legame al target:

- a) saggio di potenza basato su Biacore
- b) saggio di potenza basato su ELISA
- c) saggio con biomarcatore di farmacodinamica dell'attività del cofattore indotta da ristocetina (RICO)
- d) determinazione dell'affinità basata su Gyrolab

Questi saggi consentivano un confronto affiancato del prodotto farmaceutico liquido e liofilizzato di ALX-0081 (caplacizumab). Per valutare la comparabilità per ciascun saggio sono stati usati criteri di comparabilità predefiniti che sono elencati nella Tabella 24.

7.13.2 Metodi

[0284]

- a) Il saggio Biacore si basa sulla tecnologia di risonanza plasmonica superficiale (SPR) e misura il legame avido di ALX-0081 al dominio del vWF umano immobilizzato su un chip sensore. Il saggio è stato

selezionato per testare la potenza al rilascio e sulla stabilità.

b) Il saggio di potenza basato su ELISA è un metodo ortogonale per testare la potenza di ALX-0081 che è stato sviluppato per un'ulteriore caratterizzazione della capacità di neutralizzazione del target di caplacizumab. Questo saggio misura l'inibizione del legame indotto da ristocetina del fattore di von Willebrand (vWF) a piastrine legate da parte di caplacizumab.

c) Il saggio RICO è usato come marcatore di farmacodinamica per l'attività farmacologica di caplacizumab. Il saggio misura la velocità e la misura in cui piastrine umane liofilizzate formano aggregati dopo l'aggiunta dell'antibiotico ristocetina, che mima l'attivazione del vWF indotta da sforzo di taglio.

d) Il saggio basato su Gyrolab analizza le interazioni cinetiche di caplacizumab con il suo vWF multimerico target e determina la costante di affinità di caplacizumab al vWF multimerico umano. In breve, la determinazione dell'affinità sulla piattaforma Gyrolab è stata determinata come segue: sono stati usati CD di Gyrolab Bioaffy 1000. Come strumento di cattura, è stato applicato vWF 3000 nM biotilinato purificato

internamente (HaemateP purificato usando cromatografia a esclusione dimensionale) sulle colonne che erano pre-impaccate con perle rivestite con streptavidina. Per la diluizione dello strumento di cattura si è usato D-PBS sterilizzato per filtrazione contenente Tween-20 allo 0,01%. Si è pre-incubata una serie di diluizioni 1/3 di vWF purificato HaemateP per 24 ore a t.a. (+20 °C) in una piastra a 96 pozzetti su un rotore a 600 giri/minuto con una concentrazione fissa di caplacizumab (5 pM) in tampone AD1 (tampone diluente di saggio per curva dose-risposta). Dopo 24 ore, si è centrifugata la piastra per 1 minuto a 200 g. Si sono introdotti 70 µl della miscela di pre-incubazione, contenente le molecole di caplacizumab libero, in una piastra per PCR a pozzetti profondi. Quindi, si è fatta fluire questa miscela sulla colonna in modo che il caplacizumab libero potesse legarsi al vWF biotilinato immobilizzato sulla colonna. Il sistema Gyrolab trasferiva automaticamente la miscela in triplicato sui CD. Il caplacizumab libero è stato rilevato con anticorpo monoclonale anti-caplacizumab marcato con AlexaFluor647 50 nM diluito in tampone Rexpip F (tampone di rivelazione disponibile commercialmente). Sono stati eseguiti tre esperimenti indipendenti per

determinare la KD finale. I fluorocromi sono stati eccitati dal laser rosso cosicché si sono ottenuti segnali fluorescenti che sono stati amplificati mediante un tubo fotomoltiplicatore (PMT). Il livello di amplificazione di questo saggio era l'1% di PMT. Per la determinazione della KD di caplacizumab è stato usato un modello di analisi del ligando non noto. L'analisi è stata eseguita con il software Xlfit della Gyrolab workstation.

7.13.3 Risultati

[0285]

a) La potenza relativa dei campioni di prova di ALX-0081 liquido e liofilizzato è stata misurata in un saggio di potenza Biacore, in relazione al materiale di riferimento di ALX-0081 usato nel saggio di potenza, denominato anche standard di riferimento master 2 (MRS-2). La potenza relativa era rispettivamente del 102,8% e 102,9%, indicando la piena comparabilità rispetto alla potenza biologica determinata tramite Biacore (si veda la Tabella 24).

b) La potenza relativa dei campioni di prova di ALX-0081 liquido e liofilizzato è stata determinata nel saggio di potenza basato su ELISA, in relazione al MRS-2. I valori della potenza relativa erano

rispettivamente del 99,4% e 109,5% e quindi rientrano ampiamente nei criteri di comparabilità (si veda la Tabella 24). Pertanto, questi risultati indicano che entrambe le formulazioni sono comparabili rispetto alla potenza determinata tramite ELISA.

c) L'attività RICO dei campioni di prova di ALX-0081 liquido e liofilizzato è stata misurata in un confronto affiancato ed è stata determinata la concentrazione per bloccare completamente l'attività RICO (<20%). La concentrazione per bloccare completamente l'attività RICO (<20%) era $\leq 0,4$ $\mu\text{g/ml}$ per entrambe le formulazioni. Questi risultati rientrano ampiamente nei criteri di comparabilità (si veda la Tabella 24) e indicano una piena comparabilità rispetto all'attività farmacodinamica di entrambe le formulazioni.

d) È stata determinata anche la costante di affinità (valore K_D) dei campioni di prova di ALX-0081 liquido e liofilizzato in un confronto affiancato nel saggio basato su Gyrolab. I valori K_D erano rispettivamente di 6,84 pM e 4,46 pM, con intervalli di confidenza in sovrapposizione. Pertanto, questi risultati indicano una piena comparabilità di entrambe le formulazioni rispetto all'affinità per il vWF multimerico target (si veda la Tabella 24).

7.13.4 Conclusione

[0286] Lo scopo di questo studio era quello di valutare la comparabilità *in vitro* del prodotto farmaceutico liquido e liofilizzato di ALX-0081 (caplacizumab) mediante quattro saggi, in grado di valutare l'attività biologica *in vitro* e il legame al target:

- a) saggio di potenza basato su Biacore
- b) saggio di potenza basato su ELISA
- c) saggio con biomarcatore di farmacodinamica dell'attività del cofattore indotta da ristocetina (RICO)
- d) determinazione dell'affinità basata su Gyrolab

[0287] Tutti i saggi *in vitro* soddisfacevano i criteri di accettazione predefiniti e mostravano che entrambe le formulazioni di ALX-0081 erano comparabili in termini di attività biologica e legame al target (si veda la Tabella 24). Le formulazioni di ALX-0081 DP liquide e liofilizzate testate presentavano:

- una potenza relativa simile determinata tramite saggio Biacore ed ELISA
- un'attività farmacodinamica comparabile *in vitro* (neutralizzazione del target) tramite saggio RICO
- un'affinità per il target comparabile tramite saggio Gyrolab.

7.14 Prove di stabilità accelerata e a lungo termine di formulazioni di ALX-0081 liquide e liofilizzate.

[0288] A integrazione dell'Esempio 7.12, sono stati condotti esperimenti di stabilità indipendenti usando un lotto diverso di ALX-0081 con la stessa formulazione [tampone citrato 20 mM pH 6,5, saccarosio al 7% (p/v) e Tween-80 allo 0,01% (v/v)].

È stata testata la stabilità di entrambe le formulazioni liofilizzata e liquida a temperature diverse:

- La formulazione liquida di 13,8 mg/ml di ALX-0081 in tampone citrato 20 mM pH 6,5, saccarosio al 7% (p/v) e Tween-80 allo 0,01% (v/v) è stata conservata a temperature ≤ -60 °C e $+5$ °C (± 3 °C) e testata per la stabilità a punti temporali diversi, ossia iniziale, 9 mesi, 12 mesi, 18 mesi e 24 mesi.
- La formulazione liofilizzata di 12,7 mg/ml di ALX-0081 in tampone citrato 20 mM pH 6,5, saccarosio al 7% (p/v) e Tween-80 allo 0,01% (v/v) è stata conservata a $+5$ °C (± 3 °C), $+25$ °C (± 2 °C/60 \pm 5% RH) e $+40$ °C (± 2 °C/75 \pm 5% RH). Analogamente alla formulazione liquida, la stabilità della formulazione liofilizzata è stata determinata a 0, 9, 12, 18 e 24 mesi.

[0289] A ciascun punto temporale è stata monitorata la

stabilità chimica e fisica dei campioni usando un numero di tecniche analitiche, inclusi cIEF, RP-HPLC, SE-HPLC, aspetto visivo, pH e assorbimento UV. Il tenore di umidità della polvere liofilizzata è stato determinato mediante titolazione colorimetrica. La potenza relativa dei campioni liquidi e liofilizzati è stata misurata in Biacore in relazione a uno standard di riferimento interno di ALX-0081.

Nelle Tabelle dalla 25 alla 26 e nelle Tabelle dalla 27 alla 29 sono forniti dati di caratterizzazione dettagliati dei campioni rispettivamente per le formulazioni liquida e liofilizzata. I campioni che soddisfacevano i criteri come riportati nella colonna 2 di ciascuna delle summenzionate Tabelle sono stati considerati rientrare nelle specifiche del prodotto.

[0290] I dati ottenuti dimostrano che la formulazione dell'invenzione è altamente stabile per almeno 24 mesi. Né le caratteristiche fisicochimiche né l'attività biologica di ALX-0081 liofilizzato erano influenzate significativamente da 24 mesi di conservazione a +5 °C o +25 °C. Quando ALX-0081 è stato sottoposto a stress per 24 mesi a +40 °C è stato osservato un aumento del post-picco 2, corrispondente alla formazione della variante di piroglutammato dall'1,1% nel materiale di

partenza al 2,8%, 3,2%, 4,2% e 6,2% dopo rispettivamente 9, 12, 18 e 24 mesi.

La conservazione di formulazioni di ALX-0081 liquide per almeno 24 mesi a temperature ≤ -60 °C o a +5 °C non influiva significativamente sulla loro stabilità fisicochimica: i valori del tenore erano stabili, i campioni rimanevano trasparenti e i profili cIEF, RP-HPLC e SE-HPLC del materiale iniziale erano comparabili a quelli dei campioni di stabilità.

[0291] I cambiamenti riportati per i campioni liofilizzati conservati a +40 °C possono essere attribuiti alle condizioni di conservazione stressate e forniscono una buona indicazione per la stabilità alla conservazione a lungo termine in condizioni più miti.

Predizione della stabilità a lungo termine

[0292] Le specifiche del prodotto farmaceutico attuale indicano che la percentuale consentita di piroglutammato è $\leq 4\%$. In base a questa specifica e ai dati attuali di stabilità, è stata impiegata l'equazione di Arrhenius per predire la durata di vita del prodotto farmaceutico liofilizzato a +5 °C e +25 °C. L'equazione di Arrhenius è una formula accurata per descrivere la dipendenza dalla temperatura della velocità di reazione che è comunemente usata nel

settore farmaceutico. Come mostrato nelle Figure 10 e 11, si prevede che il prodotto farmaceutico liofilizzato rimanga all'interno delle specifiche per almeno 500 mesi quando conservato a +5 °C e per almeno 60 mesi quando conservato a +25 °C.

7.15 Conclusione generale

[0293] L'invenzione di riformulazione per leganti del vWF e in particolare per ALX-0081 descritta nel presente documento ha fornito una nuova formulazione a base di citrato/saccarosio con solubilità migliorata (fino a 80 mg/ml) e stabilità alla conservazione del liquido significativamente migliorata (per esempio meno ossidazione rispetto alla sua formulazione originale). Inoltre, nella forma liofilizzata, non si è potuta rilevare essenzialmente alcuna ossidazione o isomerizzazione dell'asp dopo 12 o perfino 24 mesi di conservazione a +40 °C. L'ulteriore ottimizzazione della concentrazione di citrato e saccarosio determinava una riduzione del tenore di umidità del prodotto liofilizzato, in tal modo minimizzando la velocità di formazione di piroglutammato. È stato dimostrato che ciascuna caratteristica fisicochimica del legante del vWF era influenzata in modo diverso dai diversi costituenti, fisici nonché chimici, della

formulazione, come scelta del tampone, pH, concentrazione, eccipiente e così via. Nel presente documento sono fornite varie formulazioni ottimizzate per rimediare a o impedire diversi stress chimici e/o fisici.

È stato progettato un tampone di formulazione che soddisfaceva i criteri più critici: citrato 20 mM pH 6,5 + saccarosio al 7,0% (p/v) + Tween-80 allo 0,01% (v/v). Usando questa formulazione, ALX-0081 ha dimostrato di essere stabile per almeno 12 o perfino 24 mesi a -20 °C, +5 °C, +25 °C e +40 °C. Questi dati indicano chiaramente una durata di vita considerevolmente più lunga a +5 °C rispetto all'attuale formulazione liquida.

In aggiunta gli inventori hanno ampiamente dimostrato che la formulazione contemporanea di ALX-0081 che è stata usata a oggi negli studi clinici è comparabile alla nuova formulazione di ALX-0081 liofilizzata ottimizzata presentata nel presente documento in termini di attività biologica *in vitro* e legame al target.

Tabella A-1: Esempi di leganti del vWF

Nome	SEQ ID NO	Sequenza
12A02H1-3a-12A02H1 (ALX-0081)	1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKRELVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNLSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQP SLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKRELVA AISRTGGSTYYPDSVE GRFTISRDNAKRMVYLQMNLSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSE YTFWGQGTQVTVSS
12A02-3a-12A02	2	QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNLSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQAGG ALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVA AISRTGGSTYYPDSVE GRFTISRDNAKRMVYLQMNLSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSE YTFWGQGTQVTVSS
12A02-GS9-12A02	3	QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNLSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGG LVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVA AISRTGGSTY YPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNLSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRV RTLPSSEYTFWGQGTQVTVSS
12A02-GS30-12A02	4	QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNLSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGG SGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFR QAPGKERDLVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNLSL PEGTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS
12A05-3a-12A05	5	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGMYRQAPGKQRELVA TITSGGSTNYADPVKGRFTISRDPKNTVYLQMNLSLRAEDTAVYYCYAN LKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQP LASGRIFSIGAMGMYRQAPGKQRELVA TITSGGSTNYADPVKGRFTISR DGPKNVYLQMNLSLRAEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTV SS
12A05-GS9-12A05	6	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGMYRQAPGKQRELVA TITSGGSTNYADPVKGRFTISRDPKNTVYLQMNLSLRAEDTAVYYCYAN LKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQP SLRLSCLASGRIFSIGAMGMYRQAPGKQRELVA TITSGGSTNYADPVK RFTISRDPKNTVYLQMNLSLRAEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFNDYWGQ GTQVTVSS
12A05-GS30-12A05	7	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGMYRQAPGKQRELVA TITSGGSTNYADPVKGRFTISRDPKNTVYLQMNLSLRAEDTAVYYCYAN LKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGMYRQAPGKQ RELVA TITSGGSTNYADPVKGRFTISRDPKNTVYLQMNLSLRAEDTAVY YCYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSS
12B06-3a-12B06	8	QVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDVVA AISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNLSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQAGG ALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDVVA AISRTGGSTYYARSVE GRFTISRDNAKRMVYLQMNLSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSE YTFWGQGTQVTVSS
12B06-GS9-12B06	9	QVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDVVA AISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNLSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGG LVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDVVA AISRTGGSTY YARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNLSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRV RTLPSSEYTFWGQGTQVTVSS

12B06-GS30-12B06	10	QVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDVVA AISRTEGGSTYYARSVEGRFTISRDNKRMVYLQMNALKPEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFR QAPGKERDVVAISRTEGGSTYYARSVEGRFTISRDNKRMVYLQMNALK PEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSS
12A02H4-3a-12A02H4	11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTEGGSTYYPDSVEGRFTISRDNKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAAISRTEGGSTYYPDSVE GRFTISRDNKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSE YTFWGQGTQVTVSS
12B06H2-3a-12B06H2	12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVVA AISRTEGGSTYYARSVEGRFTISRDNKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVVAAISRTEGGSTYYARSVE GRFTISRDNKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSE YNFWGQGTQVTVSS
12A02H1-GS9-12A02H1	13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTEGGSTYYPDSVEGRFTISRDNKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAAISRTEGGSTY YPDSVEGRFTISRDNKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRV RTLPSYTFWGQGTQVTVSS
12A02H4-GS9-12A02H4	14	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTEGGSTYYPDSVEGRFTISRDNKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAAISRTEGGSTY YPDSVEGRFTISRDNKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRV RTLPSYTFWGQGTQVTVSS
12B06H2-GS9-12B06H2	15	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVVA AISRTEGGSTYYARSVEGRFTISRDNKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVVAAISRTEGGSTY YARSVEGRFTISRDNKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRV RTLPSYTFWGQGTQVTVSS
12A02H1-GS30-12A02H1	16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTEGGSTYYPDSVEGRFTISRDNKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFR QAPGKGRELVAAISRTEGGSTYPDSVEGRFTISRDNKRMVYLQMNSLR AEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS
12A02H4-GS30-12A02H4	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTEGGSTYYPDSVEGRFTISRDNKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFR QAPGKGRELVAAISRTEGGSTYPDSVEGRFTISRDNKRSVYLQMNSLR AEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS
12B06H2-GS30-12B06H2	18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVVA AISRTEGGSTYYARSVEGRFTISRDNKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFR QAPGKGREVVAAISRTEGGSTYYARSVEGRFTISRDNKRMVYLQMNSLR AEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSS
12A02H1	19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTEGGSTYYPDSVEGRFTISRDNKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS

Tabella A-2

Nome	SEQ ID NO	Sequenza
vWF umano	20	MIPARFAGVLLALALILPGTLCAEGTRGRSSTARCSLFGSDFVNTFDGSMYSFAG YCSYLLAGGCQKRSFSIIGDFQNGKRVLSVYLGEFFDIHLFVNGTVTQGDQRVS MPYASKGLYLETEAGYYKLSGEAYGFVARIDGSGNFQVLLSDRYFNKTCGLCGNF NIFAEDDFMTQEGTLTSDPYDFANSWALSSGEQWCERASPPSSCNISSGEMQKG LWEQCQLLKSTSVFARCHPLVDPEPFVALCEKTLCECAGGLECACPALLEYARTC AQEGMVLYGWTDHSACS P VCPAGMEYRQCVSPCARTCQSLHINEMCQERCVDGCS CPEGQLLDEGLCVESTTEPCVHSGKRYPPGTSLSRDCNTCICRNSQWICSNEECP GECLVTGQSHFKSFDNRYFTFSGICQYLLARDQCQDHSFSIVIETVQCADDRDAVC TRSVTVRLPGLHNSLVKLLKHGAGVAMDGQDIQLPLLLKGDRLRIQHTVTASVRLSYG EDLQMDWDGRGRLLVKLSVYAGKTCGLCGNYNGNQDDFLTSPGLAEPVDFG NAWKLGDCQDLQKQHS DPCALNPRMTRFSEEACAVLTSPTFEACHRAVSPLPYL RNCRYDVCSCSDGRECLCGALASYAAACAGRGVRAWREPGRCELNCPKGQVYLQ CGTPCNLTCSRSLSYPDDEECNEACLEGCFPPGLYMDERGDVCPKAQCPCYYDGEI FQPEDIFSDHHTMCYCEDGFMHCTMSGVPGSLLPDAVLSSPLSHRSKRSLSCRPP MVKLVCPADNLRAEGLECTKTQNYDLECMSMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALE RCPCFHQKEYAPGETVKIGCNTCVCRRDKWNC TDHVC DATCSTIGMAHYLTFDG LKYLFPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNKGC SHPSVKCKKRV TILVEGGEIE LFDGEVNVKRPMDETHFEVVESGRYI I LLLGKALS VVWDRHLS ISVVLKQTYQE KVCGLCGNFDGIQNNDLTS SNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVP L DSSPAT CHNNIMQTMVDSSCRILTS DVFQDCNKLV DPEYLDVCIYDTCSCESIGDCACF CDTIAAYAHVCAQHGVVTRWRTATLCPQSC EERNLRENGYECEWRYNSCAPACQV TCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKILDELLQTCVDPEDCPVEVAGRFRASGK KVTLNPSDPEHCQICHCDVNVLTCEACQEPGGLVVPPTDAPVSP T TLYVEDISEP PLHDFYCSRLDLVFLLDGSSRLSEAEFEVLKAFVVDMMERLRI SQKWVRVAVVE YHDGSHAYIGLDRKRPSLELRRIASQVKYAGSQVASTSEVLKYTLFQIFSKIDRP EASRIALLMASQEPQRMSRNFVRYVQGLK K K K V I V I P V G I G P H A N L K Q I R L I E K QAPENKAFVLSVDELEQQRDEIVSYLCDLAPEAPPPTLPPHMAQVTVGPGLRNS MVLDAVAVVLEGS D K I G E A D F N R S K E F M E E V I Q R M D V G Q D S I H V T V L Q Y S Y M V T V E YPFSEAQSKGDILQVRREIRYQGGNRTNTGLALR Y L S D H S F L V S Q G D R E Q A P N L V YMV T G N P A S D E I K R L P G D I Q V V P I G V G P N A N V Q E L E R I G W P N A P I L I Q D F E T L P R EAPDLVLQRCCSGEGLQIPTLSPAPDCSQPLDVI L L L D G S S S F P A S Y F D E M K S F A KAFISKANIGPRLTQVSVLQYGSIT T I D V P W N V V P E K A H L L S L V D V M Q R E G G P S Q IGDALGFVRYLTSEMHGARPGASKAVVILVTDVSVDSVDAADAARSNRVTVFP IGIGDRYDAAQLRILAGPAGDSNVVKLQRIEDLPTMVTLGNSFLHKLCSGFVRI C MDEGNEKRP GDVWTL PDQCHTVTCQPDGQTL L K S H R V N C D R L R P S C P N S Q S P V KVEETCGCRWTCPCVCTGSSTRHIVTFDGNFKLTGSCSYVLFQNKEQDLEVI L H NGACSPGARQGC MKSIEVKHSALSVELHSDMEVTVNGRLVSVPYVGGNMEVNVYG AIMHEVRFNHLGHIFTFTPQNNEFQLQLSPKTFASKTYGLCGICDENGANDFMLR DGTVTTDWKTLVQEWTVQRPGQTCQPILEEQLV P D S S H C Q V L L L P L F A E C H K V L APATFYAICQQDSCHQEVC E V I A S Y A H L C R T N G V C V D W R T P D F C A M S C P P S L V Y NHCEHGCPRHCDGNVSSCGDHPSEGCFPPDKVMLEGS CVPEEACTQCI G E D G V Q HQFLEAWVPDHQPCQICTCLSGRKNCTTQPCPTAKAPT C G L C E V A R L R Q N A D Q C CPEYECVCDPVSCDLPPVPHCERGLQPTLTNPGECPNFTCACRKEECKRVSPPS CPPHRLPTLRKTQCCDEYECACNCVNSTVSCPLGYLASTATNDCGCTTTTCLPDK VCVHRSTIYPVQGFWEEGCDVCTCTDMEDAVMGLRVAQCSQKPCEDSCRSGFTYV LHEGECGRCLPSACEVVTGSPRGDSQS SWKS V G S Q W A S P E N P C L I N E C V R V K E E VFIQQRNVSCPQLEVPVPCPSGFQLSCKTSACCPSCRCERMEACMLNGTVIGPGKT VMIDVCTTCRCMVQGVVISGFKLECRKTCNPPCLGYKEENNTGECGRCLPTAC TIQLRGGQIMTLKRDETLQDGCDFHCKVNERGEYFWEKRVTCPPPFDEHKCLAE GGKIMKIPGTCCDTCEEPECNDITARLQYVVKVGSCKSEVEVDIHYCQKGCASKAM YSIDINDVQDQCSCCSPTRTEPMQVALHCTNGSVVYHEVLNAMECKCSPRKCSK

Tabella 1. Riepilogo di 50 combinazioni diverse di tampone/eccipiente predette dal programma Design Expert

per ottenere le temperature di fusione più alte per ALX-0081. Le combinazioni di tampone/eccipiente sono classificate secondo il valore di T_m . Tipi diversi di tamponi sono mostrati con diverse sfumature di grigio.

Corsa	Tampone		Eccipiente 1		Glicina	NaCl	Tm
	Nome	Conc. (mM)	Nome	Conc. (mM)	Conc. (mM)	Conc. (mM)	°C
1	Fosfato pH 6.92	17.24	Trealosio	239.25	0.00	0.00	77.2772
2	Fosfato pH 6.98	16.29	Trealosio	242.04	0.00	0.00	77.2742
3	Fosfato pH 6.95	9.47	Trealosio	262.12	0.00	0.00	77.2641
4	Fosfato pH 7.50	9.47	Mannitolo	0.00	273.04	0.00	77.2096
5	Fosfato pH 7.50	25.19	Mannitolo	0.00	224.82	0.00	77.1483
6	Fosfato pH 7.50	9.47	Saccarosio	0.00	273.04	0.00	77.1399
7	Fosfato pH 7.50	28.79	Mannitolo	0.00	213.78	0.00	77.1262
8	Fosfato pH 7.50	30.88	Mannitolo	0.00	207.39	0.00	77.1117
9	Fosfato pH 7.50	32.96	Mannitolo	0.00	201.00	0.00	77.0953
10	Citrato pH 6.23	48.16	Trealosio	162.85	0.00	0.00	77.0307
11	Citrato pH 6.22	48.38	Trealosio	162.29	0.00	0.00	77.0307
12	Fosfato pH 6.87	19.89	Mannitolo	231.44	0.00	0.00	76.9832
13	Fosfato pH 7.50	9.47	Trealosio	0.00	273.04	0.00	76.9483
14	Citrato pH 7.00	60.84	Saccarosio	129.38	0.00	0.00	76.9338
15	Citrato pH 7.00	57.67	Saccarosio	137.75	0.00	0.00	76.9312
16	Fosfato pH 7.50	50.01	Mannitolo	0.00	148.72	0.00	76.9295
17	Citrato pH 7.00	84.92	Saccarosio	65.25	0.00	0.00	76.7979
18	Fosfato pH 7.06	36.18	Saccarosio	183.48	0.00	0.00	76.7972
19	Citrato pH 6.44	10.56	Trealosio	262.12	0.00	0.00	76.7449
20	Citrato pH 7.00	77.11	Mannitolo	0.00	90.04	0.00	76.7297
21	Citrato pH 7.00	75.42	Mannitolo	0.00	94.69	0.00	76.7291
22	Citrato pH 7.00	79.01	Mannitolo	81.42	0.00	0.00	76.6192
23	Citrato pH 6.17	53.45	Mannitolo	146.67	2.90	0.00	76.5956
24	Citrato pH 6.18	53.23	Mannitolo	149.46	0.00	0.00	76.5955
25	Citrato pH 6.18	53.23	Mannitolo	149.46	0.00	0.00	76.5955
26	Citrato pH 6.16	53.66	Mannitolo	148.35	0.00	0.00	76.5955
27	Tris pH 7.77	17.13	Trealosio	134.96	0.00	69.29	76.1017
28	Tris pH 8.00	89.75	Mannitolo	0.00	15.10	70.51	76.0374
29	Tris pH 8.00	92.83	Mannitolo	0.00	16.27	67.17	76.0343
30	Tris pH 8.00	93.86	Mannitolo	0.00	0.00	74.76	76.0322
31	Tris pH 7.83	17.13	Saccarosio	142.77	0.00	65.04	76.0321
32	Tris pH 7.82	17.13	Saccarosio	142.21	0.00	65.34	76.0321
33	Tris pH 8.00	82.56	Mannitolo	0.00	31.37	68.38	76.0298
34	Tris pH 8.00	97.63	Mannitolo	0.00	0.00	71.42	76.0285
35	Tris pH 8.00	95.23	Saccarosio	0.00	0.00	73.55	75.9714
36	Tris pH 8.00	97.63	Saccarosio	0.00	0.00	71.42	75.97
37	Tris pH 7.77	17.13	Mannitolo	121.58	0.00	76.59	75.5801

Corsa	Tampone		Eccipiente 1		Glicina	NaCl	Tm
	Nome	Conc (mM)	Nome	Conc (mM)	Conc (mM)	Conc (mM)	°C
38	Tris pH 8.00	61.32	Trealosio	0.00	53.45	75.37	75.3047
39	Tris pH 8.00	67.14	Trealosio	0.00	47.06	73.85	75.3027
40	Tris pH 7.81	17.13	Trealosio	0.00	140.00	69.60	75.2196
41	Istidina pH 6.50	20.03	Saccarosio	0.00	142.33	68.38	74.9111
42	Istidina pH 6.50	20.03	Saccarosio	0.00	136.52	71.42	74.91
43	Istidina pH 6.50	20.03	Saccarosio	0.00	124.90	77.50	74.9012
44	Istidina pH 6.50	20.03	Mannitolo	0.00	127.22	76.28	74.8582
45	Istidina pH 6.50	20.03	Mannitolo	0.00	131.29	74.16	74.8576
46	Istidina pH 6.50	20.03	Mannitolo	0.00	118.51	80.84	74.8558
47	Istidina pH 6.50	20.03	Mannitolo	0.00	136.52	71.42	74.8553
48	Istidina pH 6.50	20.83	Mannitolo	0.00	109.21	85.10	74.8397
49	Istidina pH 6.49	20.03	Mannitolo	0.00	146.98	65.95	74.8281
50	Istidina pH 6.50	20.03	Trealosio	0.00	144.07	67.47	74.4053

Tabella 2. Prove di solubilità di ALX-0081 in tamponi di formulazione diversi.

formulazione	pH	visiva	conc. misurata (mg/ml)	recupero (%)
D-PBS + glicina 200 mM	7.4	torbida + piccole particelle	8.1	88.6
Fosfato 10 mM + glicina 200 mM	7.4	torbida + piccole particelle	8.7	88.3
Fosfato 20 mM	7.4	torbida + particelle	4.9	96.4
Istidina 20 mM	6.5	torbida + particelle	<3.4	N.D.
Citrato 20 mM	7.0	trasparente	55.9	97.6

N.D. = non determinato

Tabella 3. Riepilogo di formulazioni liquide di ALX-0081 valutate in una prova di conservazione e di stabilità a FT, unitamente a valori di pH e osmolalità misurati.

formulazione n.	conc. (mg/ml)	tampone		eccipiente		Tween-80 (v/v)	pH misurato	osmolalità mOsm/kg		
		tipo	pH	forza	tipo					
1	20	citrato 50 mM	6.0	75 mM	NaCl	0.01%	5.9	281		
2				2.0%	mannitolo		6.0	253		
3				4.0%	saccarosio		6.0	272		
4				140 mM	glicina		6.0	273		
5			6.5	75 mM	NaCl		6.5	288		
6				2.0%	mannitolo		6.5	266		
7				4.0%	saccarosio		6.6	280		
8				140 mM	glicina		6.6	280		
9			7.0	75 mM	NaCl		6.9	279		
10				2.0%	mannitolo		7.0	259		
11				4.0%	saccarosio		7.1	271		
12				140 mM	glicina		7.0	278		
13			5	D-PBS	7.1		75 mM	NaCl	6.9	274
14							2.0%	mannitolo	7.0	254
15							4.0%	saccarosio	7.0	267
16							140 mM	glicina	7.0	274
17				137/200 mM	NaCl/glicina	7.2	470			

Tabella 4. Riepilogo dello studio di stabilità alla conservazione di formulazioni di ALX-0081 diverse. Sono indicati i punti temporali, le temperature di conservazione e i metodi.

punto temporale	temperatura		formulazione n. come indicato nella Tabella 3	metodi		
	-70°C	+40°C		RP-HPLC	cIEF	SE-HPLC
1 settimana	X	X	1-17	X		
2 settimane	X	X	1-17	X		
1 mese	X	X	1-17	X	X	X

Tabella 5. Dati di stabilità alla conservazione per le diverse formulazioni liquide di ALX-0081. Sono mostrate le aree superficiali relative dei picchi RP-HPLC più rilevanti dopo 1 mese di conservazione a +40 °C. Piro =

piroglutammato, principale = picco principale (incluso il picco di spalla, quando presente), ossidazione = pre-picchi collettivamente. Il codice colore indica la purezza relativa del campione: purezza più alta in bianco, purezza intermedia in grigio e purezza più bassa in nero. Il recupero era $\pm 100\%$ per tutti i campioni.

formulazione n.	conc. (mg/ml)	tampone		eccipiente		Tween-80 (v/v)	% area dei picchi RP-HPLC				
		tipo	pH	forza	tipo		ossidazione	principale	piro		
1	20	citrato 50 mM	6.0	75 mM	NaCl	0.01%	1.5	88.6	3.7		
2				2.0%	mannitolo		1.7	88.1	4.3		
3				4.0%	saccarosio		1.7	88.1	4.6		
4				140 mM	glicina		2.2	88.3	3.9		
5			6.5	75 mM	NaCl		2.5	88.5	3.6		
6				2.0%	mannitolo		2.7	87.5	4.5		
7				4.0%	saccarosio		2.3	88.0	4.2		
8				140 mM	glicina		4.6	85.2	4.3		
9			7.0	75 mM	NaCl		2.4	86.8	5.2		
10				2.0%	mannitolo		2.6	86.0	5.9		
11				4.0%	saccarosio		2.8	85.9	6.1		
12				140 mM	glicina		4.7	82.8	6.2		
13			5	D-PBS	7.1		75 mM	NaCl	2.3	86.8	5.2
14							2.0%	mannitolo	2.4	86.5	5.8
15							4.0%	saccarosio	2.1	87.7	5.2
16							140 mM	glicina	5.0	83.1	6.4
17				137/200 mM	NaCl/ glicina	9.0	75.2	6.4			

Tabella 6. Riepilogo di formulazioni liofilizzate/liquide di ALX-0081 valutate in una prova di stabilità alla conservazione.

formulazione n.	conc. (mg/ml)	tampone		eccipiente		Tween-80 (v/v)
		tipo	pH	forza	tipo	
3	20	citrato 50 mM	6.0	4.0% (p/v)	saccarosio	0.01%
7			6.5	4.0% (p/v)	saccarosio	
17	5	D-PBS	7.1	137/200 mM	NaCl/glicina	

Tabella 7. Recupero di ALX-0081 in formulazioni diverse dopo liofilizzazione e ricostituzione riferito alle aree totali riportate mediante RP-HPLC e SE-HPLC.

recupero dopo liofilizzazione/ricostituzione (%)	citrato pH 6.0 + saccarosio (formulazione 3)	citrato pH 6.5 + saccarosio (formulazione 7)	D-PBS + glicina (formulazione 17)
RP-HPLC	104.3	105.4	103.2
SE-HPLC	101.3	99.6	102.8

Tabella 8. Riepilogo dei dati di stabilità alla conservazione delle diverse formulazioni liofilizzate di ALX-0081 (1,5 mesi di conservazione a -20 °C, +5 °C, +25 °C e +40°C. Il codice colore rappresenta una valutazione qualitativa della stabilità del campione, variabile da bianco (stabilità più alta) attraverso sfumature di grigio fino a nero (stabilità più bassa). N.T. = non testato (*rispetto a campione di controllo liquido mantenuto a -70 °C)

conservazione 1.5 mesi		citrato pH 6.0 + saccarosio (formulazione 3)				citrato pH 6.5 + saccarosio (formulazione 7)				D-PBS + glicina (formulazione 17)			
		-20°C	+5°C	+25°C	+40°C	-20°C	+5°C	+25°C	+40°C	-20°C	+5°C	+25°C	+40°C
visiva		torta non influenzata da conservazione + la ricostituzione con acqua Milli-Q rende trasparente la soluzione in tutti i campioni											
tenore	conc. (mg/ml)	N.T.	N.T.	N.T.	21.1	N.T.	N.T.	N.T.	21.2	N.T.	N.T.	N.T.	4.89
	recupero (%)	N.T.	N.T.	N.T.	106	N.T.	N.T.	N.T.	105	N.T.	N.T.	N.T.	101
pH		N.T.	N.T.	N.T.	6.1	N.T.	N.T.	N.T.	6.6	N.T.	N.T.	N.T.	7.0
osmolalità (mOsm/kg)		N.T.	N.T.	N.T.	289	N.T.	N.T.	N.T.	295	N.T.	N.T.	N.T.	487
RP-HPLC	% area picco principale	92.9	92.9	92.3	89.7	93.0	92.9	92.8	91.4	92.3	92.1	88.9	65.8
	% area pre picchi	2.4	2.2	2.2	2.5	2.3	2.3	2.2	2.4	2.8	3.0	4.3	16.1
	% area piro	0.9	1.0	1.6	3.9	0.8	0.9	1.2	2.2	1.0	1.1	2.8	12.6
	recupero* (%)	104	102	113	100	105	102	103	102	103	105	112	96.5
cIEF	% area piro	N.T.	N.T.	N.T.	3.6	N.T.	N.T.	N.T.	1.1	N.T.	N.T.	N.T.	12.7
SE-HPLC	% area picco principale	99.9	99.9	99.9	99.8	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	100	99.9	95.8
	% area pre picchi (HMW)	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	4.2
	recupero* (%)	101	98.4	108	100	99.7	95.0	96.2	99.0	103	98.1	101	89.6

Tabella 9. Riepilogo di formulazioni di ALX-0081 valutate in una prova di stabilità alla conservazione.

conc. (mg/ml)	tempo ciclo lio (ore)	tampone citrato		saccarosio	Tween-80 (v/v)
		forza (mM)	pH		
20	±65	50	6.5	4.0%	0.01%
		32		5.5%	
		15		7.0%	
	±37	50		4.0%	
		32		5.5%	
		15		7.0%	

Tabella 10. Tenore di umidità di campioni liofilizzati di ALX-0081 e relative quantità di piroglutammato rilevate mediante RP-HPLC dopo 4 settimane a +40 °C.

conc. (mg/ml)	tempo ciclo lio (ore)	tampone citrato		saccarosio	Tween-80 (v/v)	tenore di umidità	RP-HPLC
		Forza (mM)	pH				piro
20	±65	50	6.5	4.0%	0.01%	4.87%	1.7%
		32		5.5%		2.32%	1.4%
		15		7.0%		1.27%	1.2%
	±37	50		4.0%		4.40%	1.6%
		32		5.5%		non disponibile	1.3%
		15		7.0%		2.43%	1.1%

Tabella 11. Risultati dell'ispezione visiva di formulazioni di ALX-0081 durante la conservazione a +5 °C e +25 °C. "+" = trasparente, "+/-" = leggermente torbida, "-" = opaca "h" = ora, "g" = giorni.

formulazione				conservazione a +5 °C					conservazione a +25 °C				
conc. (mg/ml)	citrato pH 6.5 (mM)	saccarosio p/v (%)	Tween-80 v/v (%)	1h	2h	19h	24h	4g	1h	2h	19h	24h	4g
28	15	----	----	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	20	----	----	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
	25	----	----	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
	30	----	----	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
	40	----	----	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
	50	----	----	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	15	5.0	----	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
	15	6.0	----	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	15	7.0	----	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	15	5.0	0.01	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
	15	6.0	0.01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	15	7.0	0.01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabella 12. Risultati di ispezione visiva, tenore e analisi SE-HPLC di formulazioni di ALX-0081 dopo 5 cicli di FT consecutivi a -20 °C (*rispetto a campione di controllo liquido mantenuto a ≤-70 °C).

formulazione				5 cicli FT a -20°C			
conc. (mg/ml)	citrato pH 6.5 (mM)	saccarosio p/v (%)	Tween-80 (v/v) (%)	visiva	tenore	SE-HPLC	
					recupero (%)*	profilo	recupero (%)*
16	20	5.0	0.01	trasparente	100	nessun effetto	105.3
		6.0			102		99.4
		7.0			99.0		103.4
	25	5.0			101		103.9
		6.0			102		98.5
		7.0			100		98.4
	30	5.0			97.2		98.8
		6.0			103		99.3
		7.0			97.5		102.8

Tabella 13. Risultati di ispezione visiva, misurazioni di recupero e osmolalità di formulazioni di ALX-0081

dopo 5 cicli di FT consecutivi a -20 °C o dopo 1 ciclo di FT + 24 ore di conservazione + 1 ciclo di FT (*rispetto a campione di controllo liquido mantenuto a ≤ -70 °C).

formulazione				5 cicli FT a -20 °C			1 ciclo FT + 24h a 25 °C + 1 ciclo FT		
conc. (mg/ml)	citrato pH 6.5 (mM)	sacca rosio p/v (%)	Tween-80 (v/v) (%)	visiva	recupero (%)	osmolalità (mOsm/kg)	visiva	recupero (%)	osmolalità (mOsm/kg)
20	20	5.0	0.01	trasparente	103	236	trasparente	101	236
		6.0			104	273		101	271
		7.0			103	304		99.4	306

Tabella 14. Parametri di liofilizzazione.

Fase n.	Descrizione	Temperatura (°C)	Pressione	Tempo (hh:mm)
1	Caricamento	20	Atmosferica	N.A.
2	Congelamento	20 → -50	Atmosferica	02:00
3	Congelamento	-50	Atmosferica	02:00
4	Evacuazione	-50	0.130 mbar	00:10
5	Essiccamento primario	-50 → -20	0.130 mbar	1:00
6	Essiccamento primario	-20	0.130 mbar	19:00
7	Essiccamento primario	-20 → 5	0.130 mbar	00:50
8	Essiccamento primario	5	0.130 mbar	05:00
7	Essiccamento primario	5 → 25	0.130 mbar	03:00
7	Essiccamento secondario	25	0.130 mbar	33:00
9	Pre-aerazione con azoto	15	0.8 bar	N.A.
10	Tappatura	15	0.8 bar	N.A.
11	Aerazione con azoto	15	Atmosferica	N.A.
Lunghezza totale (senza tappatura)				66:00

Tabella 15. Analisi RP-HPLC del picco principale (purezza) di una formulazione di ALX-0081 [12,5 mg/ml di API, Tween-80 allo 0,01% (v/v) e saccarosio al 7% (p/v) in tampone citrato 20 mM a pH 6,5].

Punto temporale (mesi)	Condizione di conservazione	Purezza media (% area picco principale)
Iniziale	-	93.3
1	-20°C	93.0
	+5°C	93.0
	+25°C/60%RH	93.0
	+40°C/75%RH	92.7
3	-20°C	93.3
	+5°C	93.3
	+25°C/60%RH	93.1
	+40°C/75%RH	92.6
6	-20°C	93.2
	+5°C	93.3
	+25°C/60%RH	93.0
	+40°C/75%RH	92.4
9	-20°C	93.4
	+5°C	93.3
	+25°C/60%RH	93.1
	+40°C/75%RH	91.8
12	-20°C	93.2
	+5°C	93.1
	+25°C/60%RH	92.8
	+40°C/75%RH	91.3

Tabella 16. Analisi RPC dei pre- e post-picchi di una formulazione di ALX-0081 [12,5 mg/ml di API, Tween-80 allo 0,01% (v/v) e saccarosio al 7% (p/v) in tampone citrato 20 mM a pH 6,5].

Punto tempo rale (mesi)	Condizione conservazione	Replicato	Pre-picchi (% area)				Post-picchi (% area)				
			3	2	1	Media 1+2+3	Media 1	Media 2	Media 3	Media 4	Media 3+4
Iniziale	-	01	0.07	0.47	1.86	2.34	3.54	0.70	0.09	0.19	0.19
		02	0.08	0.47	1.88						
1	-20°C	01	0.09	0.58	1.78	2.37	3.67	0.85	0.11	0.21	0.11
		02	0.09	0.60	1.77						
	+5°C	01	0.09	0.60	1.79	2.39	3.64	0.84	0.11	0.22	0.11
		02	0.09	0.59	1.80						
	+25°C/60%RH	01	0.09	0.60	1.77	2.40	3.66	0.91	0.11	0.22	0.11
		02	0.08	0.60	1.83						
	+40°C/75%RH	01	0.09	0.56	1.88	2.45	3.68	1.11	0.11	0.23	0.11
		02	0.09	0.63	1.83						
3	-20°C	01	0.09	0.51	1.91	2.37	3.45	0.72	0.09	0.26	0.26
		02	0.09	0.49	1.82						
	+5°C	01	0.09	0.51	1.83	2.35	3.41	0.73	0.09	0.28	0.28
		02	0.09	0.50	1.85						
	+25°C/60%RH	01	0.09	0.49	1.86	2.38	3.47	0.84	0.09	0.27	0.27
		02	0.09	0.53	1.87						
	+40°C/75%RH	01	0.09	0.53	1.89	2.41	3.44	1.32	0.09	0.31	0.31
		02	0.09	0.51	1.88						
6	-20°C	01	0.07	0.52	1.85	2.40	3.49	0.71	0.08	0.21	0.21
		02	0.07	0.54	1.89						
	+5°C	01	0.06	0.53	1.79	2.33	3.47	0.72	0.09	0.22	0.22
		02	0.07	0.54	1.80						
	+25°C/60%RH	01	0.07	0.54	1.82	2.40	3.50	0.93	0.09	0.22	0.22
		02	0.06	0.53	1.91						
	+40°C/75%RH	01	0.07	0.54	1.84	2.43	3.47	1.62	0.11	0.21	0.32
		02	0.07	0.55	1.92						
9	-20°C	01	0.07	0.47	1.83	2.30	3.43	0.70	0.09	0.22	0.22
		02	0.07	0.47	1.83						
	+5°C	01	0.07	0.45	1.87	2.31	3.45	0.69	0.09	0.22	0.22
		02	0.07	0.47	1.83						
	+25°C/60%RH	01	0.08	0.50	1.89	2.44	3.42	0.73	0.11	0.21	0.32
		02	0.07	0.51	1.97						
	+40°C/75%RH	01	0.07	0.49	1.84	2.32	3.46	2.07	0.13	0.24	0.37
		02	0.08	0.47	1.84						
12	-20°C	01	0.07	0.50	1.66	2.16	3.64	0.70	0.10	0.25	0.35
		02	0.07	0.49	1.66						
	+5°C	01	0.08	0.47	1.69	2.19	3.64	0.74	0.11	0.25	0.36
		02	0.06	0.49	1.72						
	+25°C/60%RH	01	0.08	0.48	1.74	2.21	3.55	1.07	0.12	0.26	0.38
		02	0.09	0.47	1.73						
	+40°C/75%RH	01	0.09	0.46	1.78	2.26	3.63	2.37	0.16	0.29	0.44
		02	0.09	0.48	1.79						

Tabella 17. Risultati della concentrazione di proteina mediante UV per una formulazione di ALX-0081 [12,5 mg/ml di API, Tween-80 allo 0,01% (v/v) e saccarosio al

7% (p/v) in tampone citrato 20 mM a pH 6,5].

Punto temporale (mesi)	Condizione conservazione	Conc. media del campione diluito (mg/ml)	Conc. media corretta in base al fattore di diluizione (mg/flacone)
Iniziale	-	0.534	13.4
1	-20°C	0.532	13.3
	+5°C	0.530	13.3
	+25°C/60%RH	0.525	13.1
	+40°C/75%RH	0.516	12.9
3	-20°C	0.501	12.5
	+5°C	0.524	13.1
	+25°C/60%RH	0.530	13.3
	+40°C/75%RH	0.534	13.4
6	-20°C	0.530	13.3
	+5°C	0.528	13.2
	+25°C/60%RH	0.531	13.3
	+40°C/75%RH	0.523	13.1
9	-20°C	0.505	12.6
	+5°C	0.504	12.6
	+25°C/60%RH	0.511	12.8
	+40°C/75%RH	0.519	13.0
12	-20°C	0.504	12.6
	+5°C	0.505	12.6
	+25°C/60%RH	0.497	12.4
	+40°C/75%RH	0.510	12.7

Tabella 18. Analisi SE-HPLC di una formulazione di ALX-0081 [12,5 mg/ml di API, Tween-80 allo 0,01% (v/v) e saccarosio al 7% (p/v) in tampone citrato 20 mM a pH 6,5].

Punto temporale (mesi)	Condizione conservazione	Pre-picco medio (% area)	Picco principale medio (% area)
Iniziale	-	0.55	99.5
1	-20°C	0.51	99.5
	+5°C	0.53	99.5
	+25°C/60%RH	0.55	99.4
	+40°C/75%RH	0.56	99.5
3	-20°C	0.47	99.6
	+5°C	0.47	99.5
	+25°C/60%RH	0.47	99.5
	+40°C/75%RH	0.48	99.5
6	-20°C	0.60	99.4
	+5°C	0.63	99.4
	+25°C/60%RH	0.65	99.4
	+40°C/75%RH	0.68	99.3
12	-20°C	0.66	99.4
	+5°C	0.68	99.3
	+25°C/60%RH	0.67	99.3
	+40°C/75%RH	0.71	99.3

Tabella 19. Risultati di prove fisiche su ALX-0081 liofilizzato conservato a -20 °C [12,5 mg/ml di API, Tween-80 allo 0,01% (v/v) e saccarosio al 7% (p/v) in tampone citrato 20 mM a pH 6,5].

Prova	Unità	iniziale	1M	3M	6M	9M	12M
Aspetto del liofilizzato	-	Torta bianca senza particelle scure	Torta bianca senza particelle scure	Torta bianca senza particelle scure	Torta bianca senza particelle scure	Torta bianca senza particelle scure	Torta bianca senza particelle scure
Aspetto della soluzione ricostituita	-	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili
Tempo di ricostituzione (ricostituito con 1 ml di WFI)	secondi	50	60	50	48	41	41
Osmolalità	mOsm/kg	298	298	297	280	-	296
pH della soluzione ricostituita	-	6.8	6.6	6.8	6.7	-	6.6
Tenore di umidità	% p/p	0.65	0.72	0.83	0.74	0.62	0.63
Particelle subvisibili mediante HIAC	particelle/ml	105 part/ml Ø ≥ 10µm;	73 part/ml Ø ≥ 10µm;	79 part/ml Ø ≥ 10µm;	50 part/ml Ø ≥ 10µm;	-	-
	particelle/ml	3 part/ml Ø ≥ 25µm	3 part/ml Ø ≥ 25µm	7 part/ml Ø ≥ 25µm	4 part/ml Ø ≥ 25µm	-	-

Tabella 20. Risultati di prove fisiche su ALX-0081 liofilizzato conservato a +5 °C [12,5 mg/ml di API, Tween-80 allo 0,01% (v/v) e saccarosio al 7% (p/v) in tampone citrato 20 mM a pH 6,5].

Prova	Unità	iniziale	1M	3M	6M	9M	12M
Aspetto del liofilizzato	-	Torta bianca senza particelle scure	Torta bianca senza particelle scure	Torta bianca senza particelle scure	Torta bianca senza particelle scure	Torta bianca senza particelle scure	Torta bianca senza particelle scure
Aspetto della soluzione ricostituita	-	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili
Tempo di ricostituzione (ricostituito con 1 ml di WFI)	secondi	50	60	55	50	43	43
Osmolalità	mOsm/kg	298	298	294	279	-	293
pH della soluzione ricostituita	-	6.8	6.6	6.8	6.7	-	6.6
Tenore di umidità	% p/p	0.65	0,76	0.72	0.72	0.80	0.68
Particelle subvisibili mediante HIAC	particelle/ml	105 part/ml Ø ≥ 10µm;	88 part/ml Ø ≥ 10µm;	49 part/ml Ø ≥ 10µm;	109 part/ml Ø ≥ 10µm;	-	-
	particelle/ml	3 part/ml Ø ≥ 25µm	5 part/ml Ø ≥ 25µm	4 part/ml Ø ≥ 25µm	7 part/ml Ø ≥ 25µm	-	-

Tabella 21. Risultati di prove fisiche su ALX-0081 liofilizzato conservato a +25 °C/60% RH [12,5 mg/ml di API, Tween-80 allo 0,01% (v/v) e saccarosio al 7% (p/v) in tampone citrato 20 mM a pH 6,5].

Prova	Unità	iniziale	1M	3M	6M	9M	12M
Aspetto del liofilizzato	-	Torta bianca senza particelle scure	Torta bianca senza particelle scure	Torta bianca senza particelle scure	Torta bianca senza particelle scure	Torta bianca senza particelle scure	Torta bianca senza particelle scure
Aspetto della soluzione ricostituita	-	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili
Tempo di ricostituzione (ricostituito con 1 ml di WFI)	secondi	50	70	52	50	40	40
Osmolalità	mOsm/kg	298	300	299	280	-	302
pH della soluzione ricostituita	-	6.8	6.6	6.8	6.7	-	6.6
Tenore di umidità	% p/p	0.65	0.83	0.68	0.93	0.99	0.89*
Particelle subvisibili mediante HIAC	particelle/ml	105 part/ml Ø ≥ 10µm;	58 part/ml Ø ≥ 10µm;	34 part/ml Ø ≥ 10µm;	45 part/ml Ø ≥ 10µm;	-	-
	particelle/ml	3 part/ml Ø ≥ 25µm	3 part/ml Ø ≥ 25µm	4 part/ml Ø ≥ 25µm	0 part/ml Ø ≥ 25µm	-	-

*Nota: *Valore medio di 2 anziché di 3 misurazioni indipendenti*

Tabella 22. Risultati di prove fisiche su ALX-0081 liofilizzato conservato a +40 °C/75% RH [12,5 mg/ml di API, Tween-80 allo 0,01% (v/v) e saccarosio al 7% (p/v) in tampone citrato 20 mM a pH 6,5].

Prova	Unità	iniziale	1M	3M	6M	9M	12M
Aspetto del liofilizzato	-	Torta bianca senza particelle scure	Torta bianca senza particelle scure	Torta bianca senza particelle scure	Torta bianca senza particelle scure	Torta bianca senza particelle scure	Torta bianca senza particelle scure
Aspetto della soluzione ricostituita	-	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili	Soluzione trasparente incolore priva di particelle visibili
Tempo di ricostituzione (ricostituito con 1 ml di WFI)	secondi	50	70	50	52	44	43
Osmolalità	mOsm/kg	298	300	299	279	-	292
pH della soluzione ricostituita	-	6.8	6.7	6.8	6.7	-	6.6
Tenore di umidità	% p/p	0.65	0.83	1.13	1.48	0.99	2.09*
Particelle subvisibili mediante HIAC	particelle/ml	105 part/ml Ø ≥ 10µm;	35 part/ml Ø ≥ 10µm;	94 part/ml Ø ≥ 10µm;	52 part/ml Ø ≥ 10µm;	-	-
	particelle/ml	3 part/ml Ø ≥ 25µm	3 part/ml Ø ≥ 25µm	20 part/ml Ø ≥ 25µm	2 part/ml Ø ≥ 25µm	-	-

*Nota: *Valore medio di 2 anziché 3 misurazioni indipendenti*

Tabella 23. Risultati della potenza di una formulazione di ALX-0081 [12,5 mg/ml di API, Tween-80 allo 0,01% (v/v) e saccarosio al 7% (p/v) in tampone citrato 20 mM a pH 6,5].

Punto temporale (mesi)	Condizione conservazione	Risultato Potenza (%)*	Limite inferiore (%)**	Limite superiore (%)***	Passa/ Non passa	Criteri accettazione
Iniziale	-	91.4	88.1	94.8	Passa	80% -120% (rispetto a riferimento)
1	-20°C	94.8	91.5	98.2	Passa	
	+5°±3°C	94.5	90.3	98.8		
	+25°C/60%RH	97.4	94.2	100.7		
	+40°C/75%RH	97.7	94.0	101.6		
3	-20°C	105.5	101.7	109.5	Passa	
	+5°±3°C	99.3	95.3	103.4		
	+25°C/60%RH	97.0	93.1	101.1		
	+40°C/75%RH	97.8	94.4	101.3		
6	-20°C	93.2	90.2	96.2	Passa	
	+5°±3°C	93.1	90.0	96.2		
	+25°C/60%RH	97.5	94.1	101.0		
	+40°C/75%RH	100.2	96.9	103.6		
9	-20°C	101.0	95.2	107.2	Passa	
	+5°±3°C	101.1	94.8	107.7		
	+25°C/60%RH	101.6	96.2	107.3		
	+40°C/75%RH	98.7	93.8	103.9		
12	-20°C	101.3	98.7	103.9	Passa	
	+5°±3°C	101.2	98.3	104.2		
	+25°C/60%RH	105.7	103.0	108.5		
	+40°C/75%RH	100.4	95.5	105.5		

Tabella 24. Risultati di comparabilità *in vitro* di caplacizumab.

Tipo studio	Metodo	Criterio per comparabilità	ALX-0081 contemporaneo	ALX-0081 liofilizzato
Attività biologica (potenza)	Risonanza plasmonica superficiale (Biacore)	Potenza relativa di 80 - 120% (rispetto a Standard di riferimento master)	102.8%	102.9%
Attività biologica (potenza)	ELISA neutralizzazione vWF	Potenza relativa di 80 - 120% (rispetto a Standard di riferimento master)	99.4%	109.5%
Attività biologica (biomarcatore)	RICO	Le concentrazioni di entrambe le formulazioni necessarie per bloccare completamente RICO (<20%) non differiscono di un fattore >5	0.4 µg/ml	0.4 µg/ml
Affinità	Gyrolab	I valori K_D di entrambe le formulazioni non differiscono statisticamente (95% di CI attorno alla stima della K_D)	6.84 pM (2.74 – 10.95)	4.46 pM (-0.18 – 9.10)

Tabella 25. Risultati di stabilità su ALX-0081 liquido conservato a ≤ -60 °C [13,8 mg/ml di API, Tween-80 allo 0,01% (v/v) e saccarosio al 7% (p/v) in tampone citrato 20 mM a pH 6.5].

Prova	Criteri accettazione	Iniziale	9M	12M	18M	24M
Tenore	12.5 ± 2.5 mg/ml	13.8 mg/ml	13.4 mg/ml	13.8 mg/ml	13.4 mg/ml	14.1 mg/ml
Purezza cIEF	$\geq 90\%$ picco principale	97% picco principale	98% picco principale	98% picco principale	98% picco principale	98% picco principale
Purezza RP-HPLC	$\geq 85\%$ picco principale $\leq 10\%$ pre-picchi 1+2+3 $\leq 6\%$ post-picco 1 $\leq 4\%$ post-picco 2	91% picco principale 2% pre-picchi 1+2+3 6% post-picco 1 1% post-picco 2	91.2% picco principale 2.1% pre-picchi 1+2+3 (1.2% pre-picco 1) 5.4% post-picco 1 1.0% post-picco 2	91.4% picco principale 1.8% pre-picchi 1+2+3 (1.2% pre-picco 1) 5.5% post-picco 1 1.0% post-picco 2	90.8% picco principale 2.4% pre-picchi 1+2+3 (1.6% pre-picco 1) 5.3% post-picco 1 1.1% post-picco 2	91.2% picco principale 2.2% pre-picchi 1+2+3 (1.4% pre-picco 1) 5.4% post-picco 1 1.1% post-picco 2
Purezza (monomero) SE-HPLC	$\geq 95\%$ picco principale	99% picco principale	99.8% picco principale	99.7% picco principale	99.6% picco principale	99.6% picco principale
pH	6.5 ± 0.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
Aspetto	Trasparente, meno opalescente del o uguale al riferimento I, incolore	Trasparente, meno opalescente del o uguale al riferimento I, incolore	Trasparente, opalescente come il riferimento I, incolore	Trasparente, meno opalescente del riferimento I, incolore	Trasparente, meno opalescente del riferimento I, incolore	Trasparente, meno opalescente del riferimento I, incolore
Potenza (Biacore) [CI:95%]	$80 \times 10^3 - 120 \times 10^3$ U/mg	93×10^3 U/mg	96×10^3 U/mg [$91 \times 10^3 - 101 \times 10^3$ U/mg]	100×10^3 U/mg [$97 \times 10^3 - 104 \times 10^3$ U/mg]	99×10^3 U/mg [$97 \times 10^3 - 101 \times 10^3$ U/mg]	94×10^3 U/mg [$93 \times 10^3 - 95 \times 10^3$ U/mg]

Tabella 26. Risultati di stabilità su ALX-0081 liquido conservato a +5 °C ± 3 °C [13,8 mg/ml di API, Tween-80 allo 0,01% (v/v) e saccarosio al 7% (p/v) in tampone citrato 20 mM a pH 6,5].

Prova	Criteri accettazione	Iniziale	9M	12M	18M	24M
Tenore	12.5 ± 2.5 mg/ml	13.8 mg/ml	13.5 mg/ml	13.9 mg/ml	13.6 mg/ml	13.1 mg/ml
Purezza cIEF	≥ 90% picco principale	97% picco principale	98% picco principale	98% picco principale	98% picco principale	97% picco principale
Purezza RP-HPLC	≥ 85% picco principale ≤ 10% pre-picchi 1+2+3	91% picco principale 2% pre-picchi 1+2+3	90.5% picco principale 2.6% pre-picchi 1+2+3	90.7% picco principale 2.5% pre-picchi 1+2+3	90.2% picco principale 2.9% pre-picchi 1+2+3	90.2% picco principale 2.8% pre-picchi 1+2+3
Purezza (monomero) SE-HPLC	≤ 6% post-picco 1 ≤ 4% post-picco 2	6% post-picco 1 1% post-picco 2	(1.7% pre-picco 1) 5.3% post-picco 1 1.4% post-picco 2	(1.8% pre-picco 1) 5.4% post-picco 1 1.3% post-picco 2	(2.1% pre-picco 1) 5.2% post-picco 1 1.5% post-picco 2	(2.1% pre-picco 1) 5.2% post-picco 1 1.5% post-picco 2
Purezza (monomero) SE-HPLC	≥ 95 % picco principale	99% picco principale	99.8% picco principale	99.8% picco principale	99.6% picco principale	99.7% picco principale
pH	6.5 ± 0.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
Aspetto	Trasparente, meno opalescente del o uguale al riferimento I, incolore	Trasparente, meno opalescente del o uguale al riferimento I, incolore	Trasparente, meno opalescente come il riferimento I, incolore	Trasparente, meno opalescente del riferimento I, incolore	Trasparente, meno opalescente del riferimento I, incolore	Trasparente, meno opalescente del o uguale al riferimento I, incolore
Potenza (BIAcore) [CI:95%]	80 x 10 ³ – 120 x 10 ³ U/mg	93 x 10 ³ U/mg	100 x 10 ³ U/mg [95 x 10 ³ - 105 x 10 ³ U/mg]	96 x 10 ³ U/mg [93 x 10 ³ - 100 x 10 ³ U/mg]	100 x 10 ³ U/mg [97 x 10 ³ - 103 x 10 ³ U/mg]	100x10 ³ U/mg [98x10 ³ -102x10 ³ U/mg]

Tabella 27. Risultati di stabilità su ALX-0081 liofilizzato conservato a +5 °C±3 °C [12,7 mg/ml di API, Tween-80 allo 0,01% (v/v) e saccarosio al 7% (p/v) in tampone citrato 20 mM a pH 6.5]

Prova	Criteri accettazione	Iniziale	9M	12M	18M	24M
Aspetto liofilizzato	Torta bianca essenzialmente priva di sostanze estranee	Torta bianca senza particelle scure	Torta bianca essenzialmente priva di sostanze estranee	Torta bianca essenzialmente priva di sostanze estranee	Torta bianca essenzialmente priva di sostanze estranee	Torta bianca essenzialmente priva di sostanze estranee
Aspetto soluzione ricostituita	Trasparente, meno opalescente del o uguale al riferimento I, incolore e priva di particelle visibili	Trasparente, meno opalescente del o uguale al riferimento I, incolore e priva di particelle visibili	Trasparente, opalescente come il riferimento I, incolore e priva di particelle visibili	Trasparente, meno opalescente del o uguale al riferimento I, incolore e priva di particelle visibili	Trasparente, meno opalescente del o uguale al riferimento I, incolore e priva di particelle visibili	Trasparente, meno opalescente del o uguale al riferimento I, incolore e priva di particelle visibili
Tenore	12.5 ± 2.5 mg/flacone	12.7 mg/flacone	12.7 mg/flacone	12.6 mg/flacone	12.4 mg/flacone	12.7 mg/flacone
Purezza cIEF	≥ 90% picco principale	96% picco principale	97% picco principale	98% picco principale	98% picco principale	97% picco principale
Purezza RP-HPLC	≥ 85% picco principale ≤ 10% pre-picchi 1+2+3 ≤ 6% post-picco 1 ≤ 4% post-picco 2	90.8% picco principale 2.3% pre-picchi 1+2+3 5.5% post-picco 1 1.1% post-picco 2	91.0% picco principale 2.2% pre-picchi 1+2+3 (1.4% pre-picco 1) 5.2% post-picco 1 1.2% post-picco 2	91.3% picco principale 2.1% pre-picchi 1+2+3 (1.4% pre-picco 1) 5.3% post-picco 1 1.1% post-picco 2	91.0% picco principale 2.3% pre-picchi 1+2+3 (1.5% pre-picco 1) 5.3% post-picco 1 1.2% post-picco 2	91.1% picco principale 2.3% pre-picchi 1+2+3 (1.5% pre-picco 1) 5.2% post-picco 1 1.2% post-picco 2
Purezza (monomero) SE-HPLC	≥ 95% picco principale	99.6% picco principale	99.8% picco principale	99.8% picco principale	99.6% picco principale	99.6% picco principale
pH	6.5 ± 0.5	6.6	6.5	6.5	6.5	6.5
Umidità residua		0.9%	0.69%	0.74%	0.76%	0.85%
Particelle subvisibili mediante PAMAS	Particelle ≥ 10 µm: ≤ 6000/flacone Particelle ≥ 25 µm: ≤ 600/flacone	14 ≥ 10 µm 0 ≥ 25 µm		359 ≥ 10 µm 13 ≥ 25 µm		6 ≥ 10 µm 0 ≥ 25 µm

Prova	Criteri accettazione	Iniziale	9M	12M	18M	24M
Potenza (BIAcore) [CI:95%]	$80 \times 10^3 - 120 \times 10^3$ U/mg	96×10^3 U/mg	100×10^3 U/mg [95 x10 ³ -105 x10 ³ U/mg]	107×10^3 U/mg [104 x10 ³ -110 x10 ³ U/mg]	101×10^3 U/mg [100 x10 ³ -103 x10 ³ U/mg]	96×10^3 U/mg [93x10 ³ -99x10 ³ U/mg]

Tabella 28. Risultati di stabilità su ALX-0081 liofilizzato conservato a +25 °C (±2 °C/60±5% RH) [12,7 mg/ml di API, Tween-80 allo 0,01% (v/v) e saccarosio al 7% (p/v) in tampone citrato 20 mM a pH 6.5]

Prova	Criteri accettazione	Iniziale	9M	12M	18M	24M
Aspetto liofilizzato	Torta bianca essenzialmente priva di sostanze estranee	Torta bianca senza particelle scure	Torta bianca essenzialmente priva di sostanze estranee	Torta bianca essenzialmente priva di sostanze estranee	Torta bianca essenzialmente priva di sostanze estranee	Torta bianca essenzialmente priva di sostanze estranee
Aspetto soluzione ricostituita	Trasparente, meno opalescente del o uguale al riferimento I, incolore e priva di particelle visibili	Trasparente, meno opalescente del o uguale al riferimento I, incolore e priva di particelle visibili	Trasparente, opalescente come il riferimento I, incolore e priva di particelle visibili	Trasparente, meno opalescente del riferimento I, incolore e priva di particelle visibili	Trasparente, meno opalescente del riferimento I, incolore e priva di particelle visibili	Trasparente, meno opalescente del o uguale al riferimento I, incolore e priva di particelle visibili
Tenore	12.5 ± 2.5 mg/flacone	12.7 mg/flacone	12.6 mg/flacone	12.6 mg/flacone	12.3 mg/flacone	13.1 mg/flacone
Purezza cIEF	≥ 90% picco principale	96% picco principale	97% picco principale	98% picco principale	97% picco principale	97% picco principale
Purezza RP-HPLC	≥ 85% picco principale ≤ 10% pre-picchi 1+2+3 ≤ 6% post-picco 1 ≤ 4% post-picco 2	90.8% picco principale 2.3% pre-picchi 1+2+3 5.5% post-picco 1 1.1% post-picco 2	90.7% picco principale 2.3% pre-picchi 1+2+3 (1.5% pre-picco 1) 5.2% post-picco 1 1.5% post-picco 2	90.8% picco principale 2.1% pre-picchi 1+2+3 (1.4% pre-picco 1) 5.2% post-picco 1 1.6% post-picco 2	90.5% picco principale 2.4% pre-picchi 1+2+3 (1.6% pre-picco 1) 5.2% post-picco 1 1.8% post-picco 2	90.4% picco principale 2.4% pre-picchi 1+2+3 (1.6% pre-picco 1) 5.2% post-picco 1 1.7% post-picco 2
Purezza (monomero) SE-HPLC	≥ 95 % picco principale	99.6% picco principale	99.8% picco principale	99.8% picco principale	99.7% picco principale	99.7% picco principale

Prova	Criteri accettazione	Iniziale	9M	12M	18M	24M
pH	6.5 ± 0.5	6.6	6.5	6.5	6.5	6.5
Umidità residua		0.9%	0.86%	1.04%	1.03%	1.30%
Particelle subvisibili mediante PAMAS	Particelle ≥ 10 µm: ≤ 6000/flacone Particelle ≥ 25 µm: ≤ 600/flacone	14 ≥ 10 µm 0 ≥ 25 µm		389 ≥ 10 µm 12 ≥ 25 µm		13 ≥ 10 µm 1 ≥ 25 µm
Potenza (BIAcCore) [Ci:95%]	80 x10 ³ - 120 x10 ³ U/mg	96 x10 ³ U/mg	100 x10 ³ U/mg [95 x10 ³ -106 x10 ³ U/mg]	102 x10 ³ U/mg [99 x10 ³ -105 x10 ³ U/mg]	103 x10 ³ U/mg [101 x10 ³ -104 x10 ³ U/mg]	90x10 ³ U/mg [87x10 ³ -94x10 ³ U/mg]

Tabella 29. Risultati di stabilità su ALX-0081 liofilizzato conservato a +40 °C (±2 °C/75±5% RH) [12,7 mg/ml di API, Tween-80 allo 0,01% (v/v) e saccarosio al 7% (p/v) in tampone citrato 20 mM a pH 6.5]

Prova	Criteri accettazione	Iniziale	9M	12M	18M	24M
Aspetto liofilizzato	Torta bianca essenzialmente priva di sostanze estranee	Torta bianca senza particelle scure	Torta bianca essenzialmente priva di sostanze estranee	Torta bianca essenzialmente priva di sostanze estranee	Torta bianca essenzialmente priva di sostanze estranee	Torta bianca essenzialmente priva di sostanze estranee
Aspetto soluzione riconsuita	Trasparente, meno opalescente del o uguale al riferimento I, incolore e priva di particelle visibili	Trasparente, meno opalescente del o uguale al riferimento I, incolore e priva di particelle visibili	Trasparente, opalescente come il riferimento I, incolore e priva di particelle visibili	Trasparente, meno opalescente del riferimento I, incolore e priva di particelle visibili	Trasparente, meno opalescente del riferimento I, incolore e priva di particelle visibili	Trasparente, meno opalescente del o uguale al riferimento I, incolore e priva di particelle visibili
Tenore	12.5 ± 2.5 mg/flacone	12.7 mg/flacone	12.5 mg/flacone	13.1 mg/flacone	12.1 mg/flacone	13.0 mg/flacone
Purezza cIEF	≥ 90% picco principale	96% picco principale	94% picco principale	96% picco principale	93% picco principale	93% picco principale

Prova	Criteri accettazione	Iniziale	9M	12M	18M	24M
Purezza RP-HPLC	<p>≥ 85% picco principale ≤ 10% pre-picchi 1+2+3</p> <p>≤ 6% post-picco 1 ≤ 4% post-picco 2</p>	<p>90.8% picco principale 2.3% pre-picchi 1+2+3</p> <p>5.5% post-picco 1 1.1% post-picco 2</p>	<p>89.2% picco principale 2.3% pre-picchi 1+2+3</p> <p>(1.4% pre-picco 1) 5.2% post-picco 1 2.8% post-picco 2</p>	<p>89.1% picco principale 2.2% pre-picchi 1+2+3</p> <p>(1.4% pre-picco 1) 5.2% post-picco 1 3.2% post-picco 2</p>	<p>87.8% picco principale 2.4% pre-picchi 1+2+3</p> <p>(1.6% pre-picco 1) 5.2% post-picco 1 4.2% post-picco 2</p>	<p>85.5% picco principale 2.4% pre-picchi 1+2+3</p> <p>(1.7% pre-picco 1) 5.3% post-picco 1 6.2% post-picco 2</p>
Purezza (monomero) SE-HPLC	≥ 95 % picco principale	99.6% picco principale	99.8% picco principale	99.8% picco principale	99.6% picco principale	99.7% picco principale
pH	6.5 ± 0.5	6.6	6.5	6.5	6.5	6.5
Umidità residua		0.9%	1.59%	2.09%	2.56%	3.34%
Particelle subvisibili mediante PAMAS	<p>Particelle ≥ 10 µm: ≤ 6000/flacone</p> <p>Particelle ≥ 25 µm: ≤ 600/flacone</p>	<p>14 ≥ 10 µm 0 ≥ 25 µm</p>		<p>873 ≥ 10 µm 18 ≥ 25 µm</p>		<p>4 ≥ 10 µm 0 ≥ 25 µm</p>
Potenza (BIAcore) [CI:95%]	80 x10 ³ – 120 x10 ³ U/mg	96 x10 ³ U/mg	100 x10 ³ U/mg [96 x10 ³ -104 x10 ³ U/mg]	97 x10 ³ U/mg [94 x10 ³ -101 x10 ³ U/mg]	108 x10 ³ U/mg [106 x10 ³ -111 x10 ³ U/mg]	93x10 ³ U/mg [91x10 ³ -95x10 ³ U/mg]

Equivalenti

[0294] La precedente descrizione scritta è considerata essere sufficiente per consentire a una persona esperta nella tecnica di realizzare l'invenzione. L'ambito della presente invenzione non è limitato dagli esempi forniti, in quanto gli esempi sono intesi come una singola illustrazione di un aspetto dell'invenzione.

RIVENDICAZIONI

1. Una formulazione comprendente un legante del Fattore di von Willebrand (vWF), un tampone citrato, saccarosio e Tween-80, in cui:

(a) il legante del vWF ha una concentrazione da 10 mg/ml a 40 mg/ml;

(b) il saccarosio ha una concentrazione del 7% (p/v);

(c) Tween-80 ha una concentrazione dello 0,01% (v/v); e

(d) il tampone citrato ha una concentrazione di 20 mM in modo che il pH della formulazione sia 6,5, e in cui detto legante del vWF comprende la SEQ ID NO: 1.

2. La formulazione secondo la rivendicazione 1, in cui detto legante del vWF è la SEQ ID NO: 1.

3. La formulazione secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui

(a) il legante del vWF ha una concentrazione da 10 mg/ml a 12,5 mg/ml.

4. La formulazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 1 alla 3, in cui

(a) il legante del vWF ha una concentrazione di 10 mg/ml o 12,5 mg/ml.

5. La formulazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 1 alla 4, che ha:

(i) meno del 5% di specie ad alto peso molecolare (HMW) dopo conservazione per almeno 12 mesi a 5 °C; e/o

(ii) meno del 5% di specie a basso peso molecolare (LMW) dopo conservazione per almeno 12 mesi a 5 °C.

6. La formulazione secondo qualsiasi delle rivendicazioni dalla 1 alla 5, in cui il legante del vWF nella formulazione mantiene almeno circa l'80% della sua stabilità dopo conservazione per almeno 12 mesi a 5 °C.

7. La formulazione secondo qualsiasi delle rivendicazioni dalla 1 alla 6, in cui almeno l'80%, preferibilmente almeno il 90%, più preferibilmente almeno il 95% o perfino almeno il 99% del legante del vWF mantiene la sua attività di legame dopo conservazione rispetto all'attività di legame prima della conservazione, detta attività di legame come misurata mediante ELISA e/o Biacore.

8. La formulazione secondo qualsiasi delle

rivendicazioni dalla 1 alla 7, che è una formulazione liquida o liofilizzata ricostituita comprendente:

- (a) un legante del vWF a una concentrazione da 10 mg/ml a 12,5 mg/ml, preferibilmente di 12,5 mg/ml;
- (b) saccarosio a una concentrazione del 7% (p/v);
- (c) Tween-80 a una concentrazione dello 0,01% (v/v); e
- (d) un tampone citrato a una concentrazione di 20 mM, in modo che il pH della formulazione sia 6,5.

9. La formulazione secondo qualsiasi delle rivendicazioni dalla 1 alla 7, che è una formulazione per conservazione in massa comprendente:

- (a) un legante del vWF a una concentrazione da 10 mg/ml a 12,5 mg/ml, preferibilmente di 12,5 mg/ml;
- (b) saccarosio a una concentrazione del 7% (p/v);
- (c) Tween-80 a una concentrazione dello 0,01% (v/v); e
- (d) un tampone citrato a una concentrazione di 20 mM, in modo che il pH della formulazione sia 6,5;

in cui almeno 100 litri della formulazione sono conservati in condizioni al di sotto del punto di congelamento.

10. La formulazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 1 alla 9, che è in forma liquida,

liofilizzata, essiccata a spruzzo, liofilizzata ricostituita o congelata.

11. Un metodo o processo per preparare una formulazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 1 alla 10, in cui detto metodo o processo comprende le fasi di:

- esprimere il legante del vWF in una coltura cellulare;

- purificare il legante del vWF facendo passare il legante del vWF attraverso almeno una tra una fase di purificazione mediante cromatografia e una fase di ultrafiltrazione/diafiltrazione;

- regolare la concentrazione del legante del vWF a da 10 a 40 mg/ml, preferibilmente a 12,5 mg/ml, in una formulazione contenente:

- (i) saccarosio a una concentrazione del 7% (p/v);

- (ii) Tween-80 a una concentrazione dello 0,01% (v/v); e

- (iii) un tampone citrato a una concentrazione di 20 mM, in modo che il pH della formulazione sia 6,5.

12. Un metodo per preparare una formulazione ricostituita secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 1 alla 10, in cui detto metodo comprende le fasi

di: (i) liofilizzare una miscela di un legante del vWF, un lioprotettore, un tensioattivo e un tampone, in tal modo formando una miscela liofilizzata; e (ii) ricostituire la miscela liofilizzata in un diluente, in tal modo preparando la formulazione, in cui la formulazione ricostituita comprende

(a) un legante del vWF a una concentrazione da 10 mg/ml a 40 mg/ml, preferibilmente di 12,5 mg/ml;

(b) saccarosio a una concentrazione del 7% (p/v);

(c) Tween-80 a una concentrazione dello 0,01% (v/v); e

(d) un tampone citrato a una concentrazione di 20 mM, in modo che il pH della formulazione sia 6,5.

13. Un kit o un articolo di fabbricazione, comprendente un contenitore contenente la formulazione secondo qualsiasi delle rivendicazioni dalla 1 alla 10, e istruzioni per l'uso.

14. Il kit o l'articolo di fabbricazione secondo la rivendicazione 13, in cui la formulazione è presente in un flacone o una siringa iniettabile.

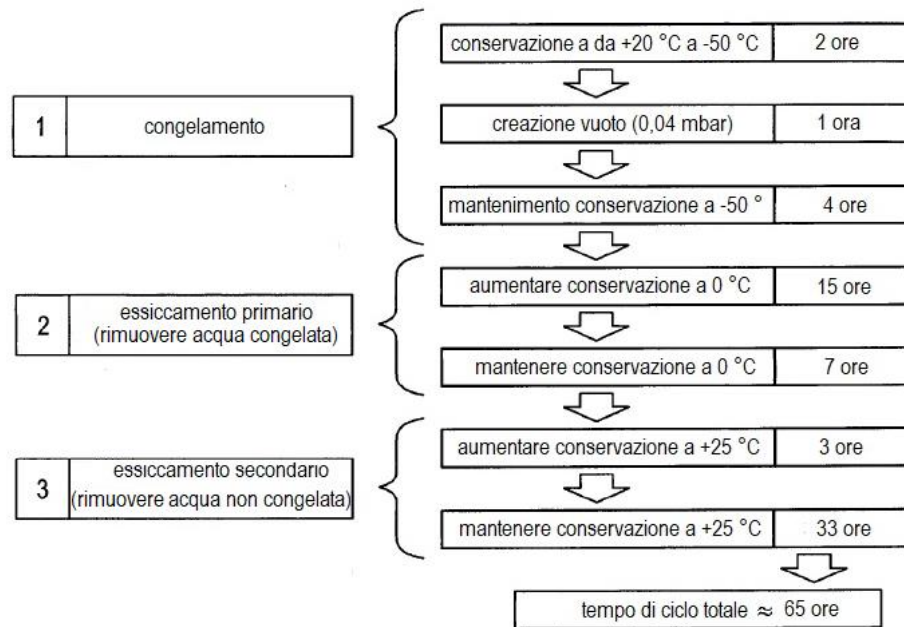


FIG. 1

2 / 13

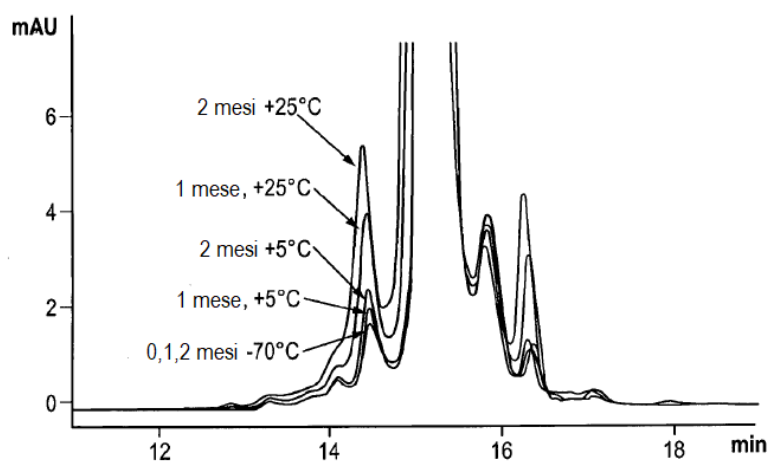


FIG. 2A

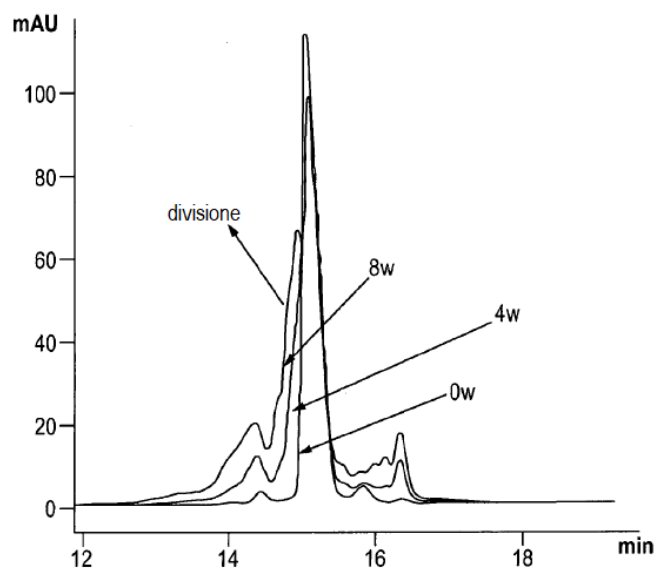


FIG. 2B

4 / 13

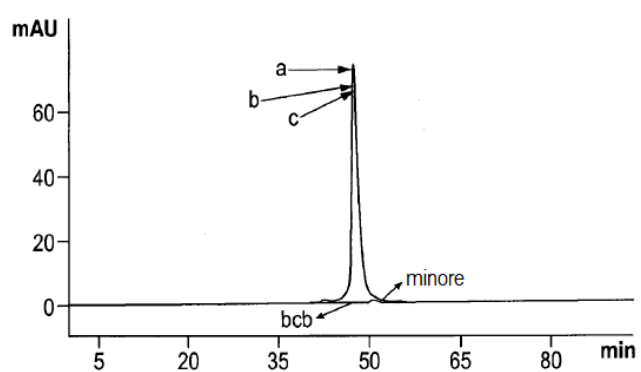


FIG. 3A

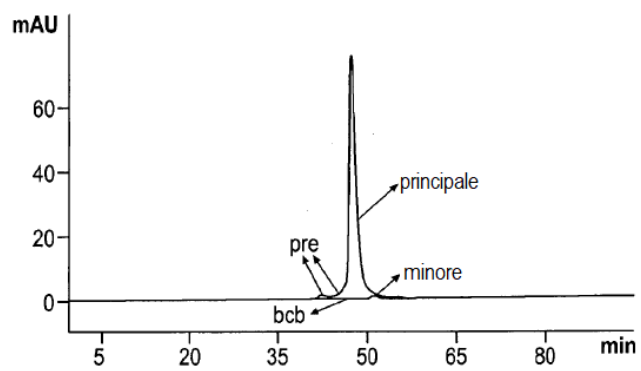


FIG. 3B

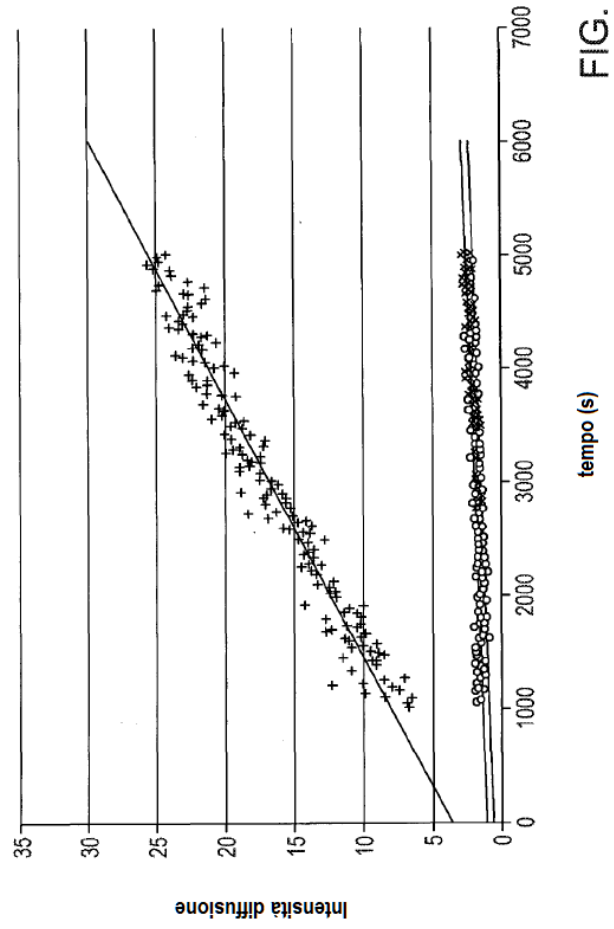


FIG. 4A

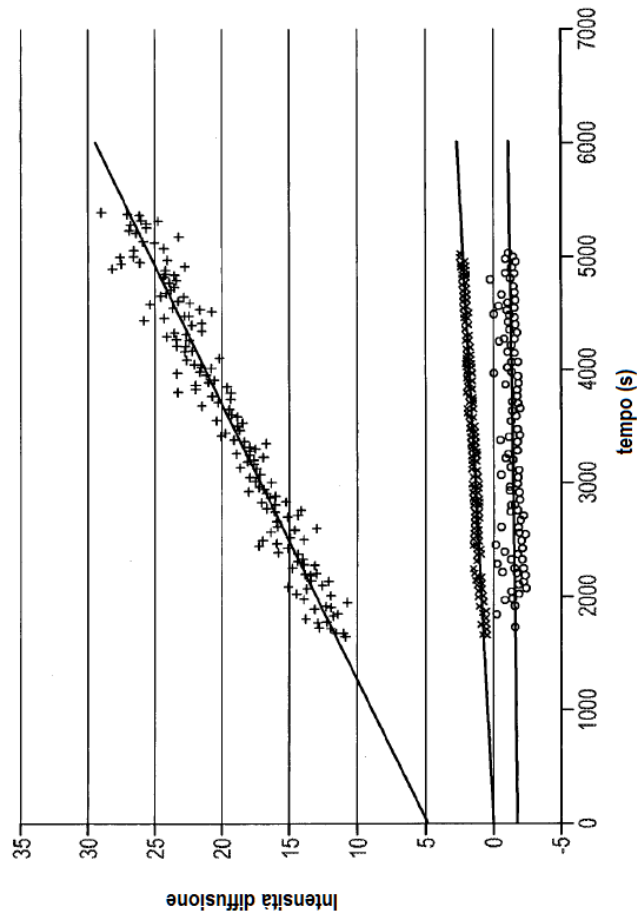


FIG. 4B

7/13

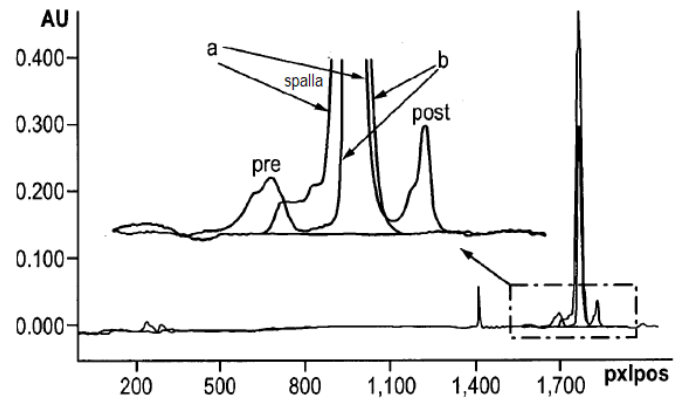


FIG. 5

8/13

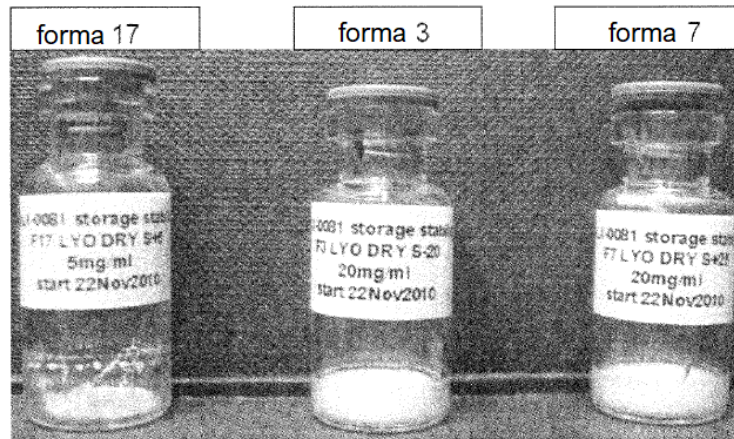


FIG. 6A

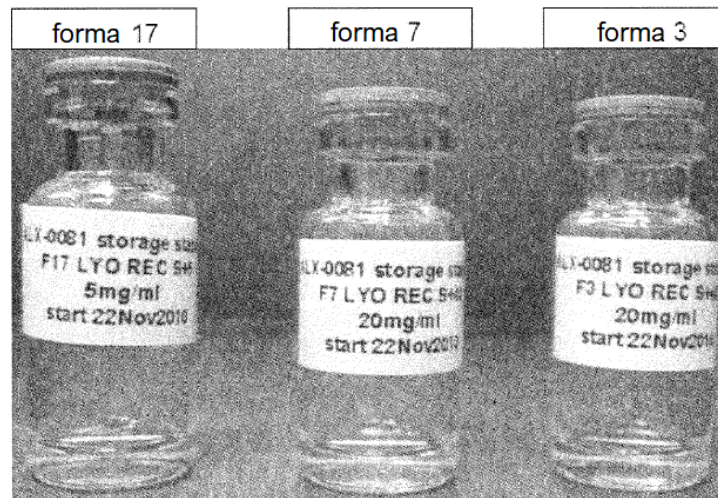


FIG. 6B

9/13

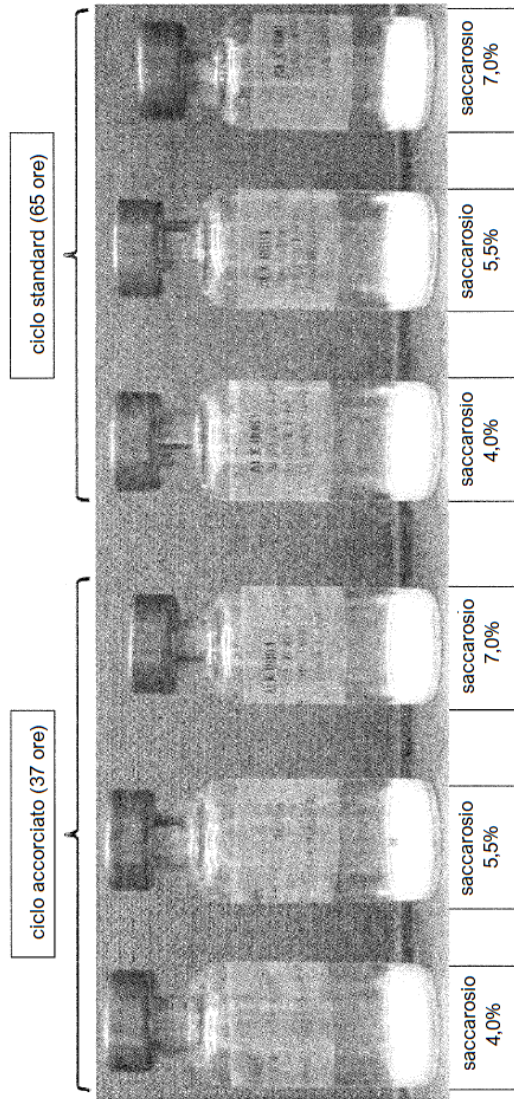


FIG. 7

10/13

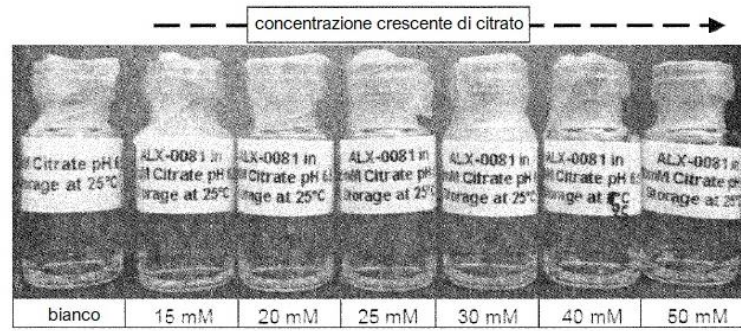


FIG. 8A

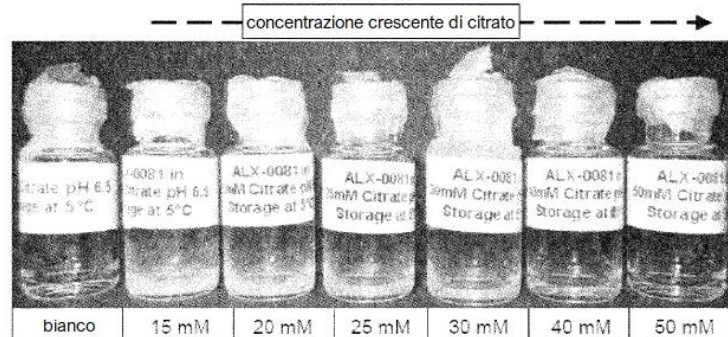


FIG. 8B

11/13

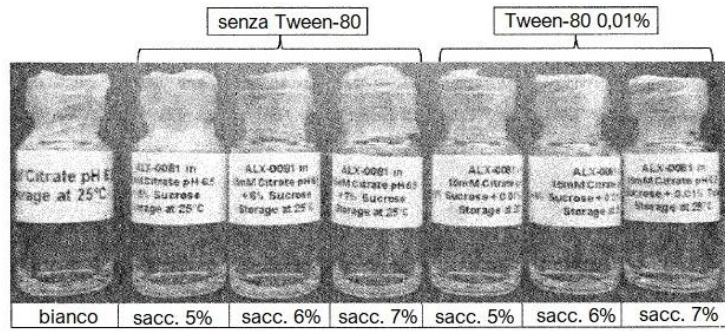


FIG. 9A

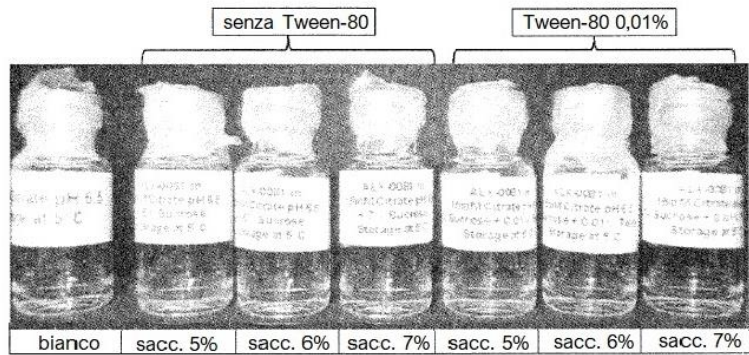


FIG. 9B

12 / 13

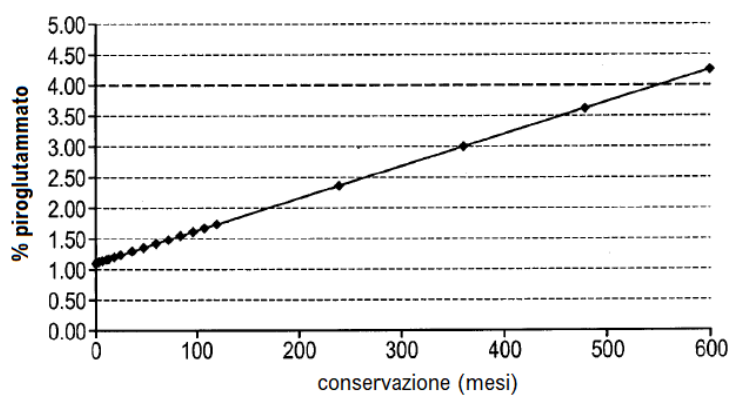


FIG. 10

13 / 13

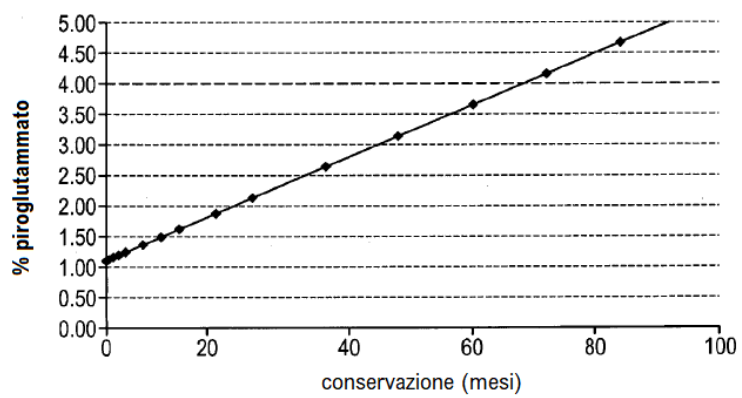


FIG. 11

Pagina 1 di 36
ELENCO DELLE SEQUENZE

<110> Ablynx NV
<120> Formulazioni stabili di domini immunoglobulinici singoli variabili e loro usi
<130> P13-001-PCT-1
<140> NL 1040254
<141> 2013-06-14
<150> US61/824523
<151> 2013-05-17
<160> 20
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 259
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> Sequenza Nanobody
<400> 1
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30
Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110
Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

Pagina 2 di 36

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
145 150 155 160

Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
165 170 175

Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro
180 185 190

Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg
195 200 205

Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg
225 230 235 240

Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
245 250 255

Val Ser Ser

<210> 2
<211> 259
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sequenza Nanobody

<400> 2

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

Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80

Pagina 3 di 36

Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

Ala Gly Gly Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
145 150 155 160

Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg
165 170 175

Asp Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro
180 185 190

Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg
195 200 205

Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg
225 230 235 240

Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
245 250 255

Val Ser Ser

<210> 3
<211> 265
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sequenza Nanobody

<400> 3

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

Pagina 4 di 36

Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala
145 150 155 160

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln
165 170 175

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly
180 185 190

Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser
195 200 205

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys
210 215 220

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala
225 230 235 240

Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly
245 250 255

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
260 265

Pagina 5 di 36

<210> 4
<211> 286
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sequenza Nanobody

<400> 4

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

Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
145 150 155 160

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ala Leu
165 170 175

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met
180 185 190

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val Ala Ala
195 200 205

Pagina 6 di 36

Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly
210 215 220

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln
225 230 235 240

Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Gly Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
245 250 255

Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu
260 265 270

Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280 285

<210> 5
<211> 247
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sequenza Nanobody

<400> 5

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly
20 25 30

Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr
85 90 95

Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Glu Val Gln
115 120 125

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg

Pagina 7 di 36

130 135 140

Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly Ala Met Gly
145 150 155 160

Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile
165 170 175

Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly Arg Phe
180 185 190

Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn
195 200 205

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala Asn Leu
210 215 220

Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 6
<211> 253
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sequenza Nanobody

<400> 6

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly
20 25 30

Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr
85 90 95

Pagina 8 di 36

Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Arg Ile Phe
145 150 155 160

Ser Ile Gly Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg
165 170 175

Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp
180 185 190

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr
195 200 205

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
210 215 220

Tyr Cys Tyr Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn
225 230 235 240

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 7
<211> 274
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sequenza Nanobody

<400> 7

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly
20 25 30

Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

Pagina 9 di 36

Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr
85 90 95

Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
145 150 155 160

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala
165 170 175

Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala
180 185 190

Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser
195 200 205

Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
210 215 220

Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu
225 230 235 240

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr
245 250 255

Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
260 265 270

Ser Ser

<210> 8
<211> 259

Pagina 10 di 36

<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> Sequenza Nanobody
<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

Ala Gly Gly Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
145 150 155 160

Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg
165 170 175

Asp Val Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
180 185 190

Arg Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg
195 200 205

Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Pagina 11 di 36

Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg
225 230 235 240

Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
245 250 255

Val Ser Ser

<210> 9
<211> 265
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sequenza Nanobody

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala
145 150 155 160

Pagina 12 di 36

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln
165 170 175

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly
180 185 190

Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser
195 200 205

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Lys
210 215 220

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala
225 230 235 240

Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly
245 250 255

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
260 265

<210> 10
<211> 286
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sequenza Nanobody

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro

Pagina 13 di 36

100 105 110

Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
145 150 155 160

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ala Leu
165 170 175

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met
180 185 190

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val Ala Ala
195 200 205

Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly
210 215 220

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln
225 230 235 240

Met Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
245 250 255

Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu
260 265 270

Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280 285

<210> 11
<211> 259
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sequenza Nanobody

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

Pagina 14 di 36

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
145 150 155 160

Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
165 170 175

Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro
180 185 190

Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg
195 200 205

Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg
225 230 235 240

Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
245 250 255

Val Ser Ser

<210> 12

Pagina 15 di 36

<211> 259
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sequenza Nanobody

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
145 150 155 160

Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
165 170 175

Glu Val Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
180 185 190

Arg Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg
195 200 205

Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Pagina 16 di 36

Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg
225 230 235 240

Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
245 250 255

Val Ser Ser

<210> 13
<211> 265
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sequenza Nanobody

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
145 150 155 160

Pagina 17 di 36

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln
165 170 175

Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly
180 185 190

Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser
195 200 205

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
210 215 220

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala
225 230 235 240

Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly
245 250 255

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
260 265

<210> 14
<211> 265
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sequenza Nanobody

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Pagina 18 di 36

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
145 150 155 160

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln
165 170 175

Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly
180 185 190

Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser
195 200 205

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
210 215 220

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala
225 230 235 240

Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly
245 250 255

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
260 265

<210> 15
<211> 265
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sequenza Nanobody

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val

Pagina 19 di 36

35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
145 150 155 160

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln
165 170 175

Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly
180 185 190

Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser
195 200 205

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
210 215 220

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala
225 230 235 240

Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly
245 250 255

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
260 265

<210> 16
<211> 286
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

Pagina 20 di 36

<220>

<223> Sequenza Nanobody

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
145 150 155 160

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
165 170 175

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met
180 185 190

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Ala
195 200 205

Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly
210 215 220

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln

Pagina 22 di 36

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
165 170 175

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met
180 185 190

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Ala
195 200 205

Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly
210 215 220

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln
225 230 235 240

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
245 250 255

Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu
260 265 270

Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280 285

<210> 18
<211> 286
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sequenza Nanobody

<400> 18

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80

Pagina 23 di 36

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
145 150 155 160

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
165 170 175

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met
180 185 190

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val Ala Ala
195 200 205

Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly
210 215 220

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln
225 230 235 240

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
245 250 255

Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu
260 265 270

Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280 285

<210> 19
<211> 128
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sequenza Nanobody

<400> 19

Página 24 di 36

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 20
<211> 2804
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile
1 5 10 15

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr
20 25 30

Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly
35 40 45

Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly
50 55 60

Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys
65 70 75 80

Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu
85 90 95

Pagina 25 di 36

Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro
100 105 110

Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys
115 120 125

Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly
130 135 140

Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly
145 150 155 160

Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln
165 170 175

Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala
180 185 190

Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser
195 200 205

Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln
210 215 220

Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu
225 230 235 240

Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu
245 250 255

Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala
260 265 270

Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His
275 280 285

Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys
290 295 300

Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met
305 310 315 320

Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu
325 330 335

Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His
340 345 350

Pagina 26 di 36

Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn
355 360 365

Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys
370 375 380

Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp
385 390 395 400

Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg
405 410 415

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys
420 425 430

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu
435 440 445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val
450 455 460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Ile Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu
465 470 475 480

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu
485 490 495

Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu
500 505 510

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn
515 520 525

Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro
530 535 540

Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln
545 550 555 560

Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met
565 570 575

Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe
580 585 590

Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys
595 600 605

Pagina 27 di 36

Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly
610 615 620

Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val
625 630 635 640

Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln
645 650 655

Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu
660 665 670

Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe
675 680 685

Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys
690 695 700

Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp
705 710 715 720

Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met
725 730 735

His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val
740 745 750

Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg
755 760 765

Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu
770 775 780

Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met
785 790 795 800

Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg
805 810 815

His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln
820 825 830

Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr
835 840 845

Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp

Pagina 29 di 36

Cys Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln
1100 1105 1110

His Gly Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln
1115 1120 1125

Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu
1130 1135 1140

Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln
1145 1150 1155

His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys
1160 1165 1170

His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln
1175 1180 1185

Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly
1190 1195 1200

Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp
1205 1210 1215

Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr
1220 1225 1230

Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr
1235 1240 1245

Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser
1250 1255 1260

Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu
1265 1270 1275

Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe
1280 1285 1290

Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg
1295 1300 1305

Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp
1310 1315 1320

Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser
1325 1330 1335

Pagina 30 di 36

Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln
1340 1345 1350

Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile
1355 1360 1365

Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu
1370 1375 1380

Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val
1385 1390 1395

Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro
1400 1405 1410

Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile
1415 1420 1425

Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val
1430 1435 1440

Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys
1445 1450 1455

Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro His Met
1460 1465 1470

Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Arg Asn Ser Met Val Leu
1475 1480 1485

Asp Val Ala Phe Val Leu Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala
1490 1495 1500

Asp Phe Asn Arg Ser Lys Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg
1505 1510 1515

Met Asp Val Gly Gln Asp Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr
1520 1525 1530

Ser Tyr Met Val Thr Val Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser
1535 1540 1545

Lys Gly Asp Ile Leu Gln Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly
1550 1555 1560

Gly Asn Arg Thr Asn Thr Gly Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp
1565 1570 1575

Pagina 31 di 36

His Ser Phe Leu Val Ser Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn
1580 1585 1590

Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys
1595 1600 1605

Arg Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro
1610 1615 1620

Asn Ala Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala
1625 1630 1635

Pro Ile Leu Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro
1640 1645 1650

Asp Leu Val Leu Gln Arg Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ile
1655 1660 1665

Pro Thr Leu Ser Pro Ala Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val
1670 1675 1680

Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe
1685 1690 1695

Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn
1700 1705 1710

Ile Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser
1715 1720 1725

Ile Thr Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala
1730 1735 1740

His Leu Leu Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro
1745 1750 1755

Ser Gln Ile Gly Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr
1760 1765 1770

Ser Glu Met His Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val
1775 1780 1785

Ile Leu Val Thr Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala
1790 1795 1800

Asp Ala Ala Arg Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile

Pagina 32 di 36

1805						1810						1815
Gly Asp	Arg Tyr	Asp Ala	Ala Ala	Gln Leu	Arg Ile	Leu Ala	Gly Pro					
1820				1825			1830					
Ala Gly	Asp Ser	Asn Val	Val Val	Lys Leu	Gln Arg	Ile Glu	Asp Leu					
1835				1840			1845					
Pro Thr	Met Val	Thr Leu	Gly Asn	Ser Phe	Leu His	Lys Leu	Cys Cys					
1850			1855				1860					
Ser Gly	Phe Val	Arg Ile	Cys Met	Asp Glu	Asp Gly	Asn Glu	Lys Lys					
1865			1870				1875					
Arg Pro	Gly Asp	Val Trp	Thr Leu	Pro Asp	Gln Cys	His Thr	Val Val					
1880			1885				1890					
Thr Cys	Gln Pro	Asp Gly	Gln Thr	Leu Leu	Lys Ser	His Arg	Val Val					
1895			1900				1905					
Asn Cys	Asp Arg	Gly Leu	Arg Pro	Ser Cys	Pro Asn	Ser Gln	Ser Ser					
1910			1915				1920					
Pro Val	Lys Val	Glu Glu	Thr Cys	Gly Cys	Arg Trp	Thr Cys	Pro Pro					
1925			1930				1935					
Cys Val	Cys Thr	Gly Ser	Ser Thr	Arg His	Ile Val	Thr Phe	Asp Asp					
1940			1945				1950					
Gly Gln	Asn Phe	Lys Leu	Thr Gly	Ser Cys	Ser Tyr	Val Leu	Phe Phe					
1955			1960				1965					
Gln Asn	Lys Glu	Gln Asp	Leu Glu	Val Ile	Leu His	Asn Gly	Ala Ala					
1970			1975				1980					
Cys Ser	Pro Gly	Ala Arg	Gln Gly	Cys Met	Lys Ser	Ile Glu	Val Val					
1985			1990				1995					
Lys His	Ser Ala	Leu Ser	Val Glu	Leu His	Ser Asp	Met Glu	Val Val					
2000			2005				2010					
Thr Val	Asn Gly	Arg Leu	Val Ser	Val Pro	Tyr Val	Gly Gly	Asn Asn					
2015			2020				2025					
Met Glu	Val Asn	Val Tyr	Gly Ala	Ile Met	His Glu	Val Arg	Phe Phe					
2030			2035				2040					

Pagina 33 di 36

Asn His Leu Gly His Ile Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu
2045 2050 2055

Phe Gln Leu Gln Leu Ser Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr
2060 2065 2070

Gly Leu Cys Gly Ile Cys Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met
2075 2080 2085

Leu Arg Asp Gly Thr Val Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln
2090 2095 2100

Glu Trp Thr Val Gln Arg Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu
2105 2110 2115

Glu Glu Gln Cys Leu Val Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu
2120 2125 2130

Leu Leu Pro Leu Phe Ala Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala
2135 2140 2145

Thr Phe Tyr Ala Ile Cys Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln
2150 2155 2160

Val Cys Glu Val Ile Ala Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn
2165 2170 2175

Gly Val Cys Val Asp Trp Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser
2180 2185 2190

Cys Pro Pro Ser Leu Val Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro
2195 2200 2205

Arg His Cys Asp Gly Asn Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser
2210 2215 2220

Glu Gly Cys Phe Cys Pro Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser
2225 2230 2235

Cys Val Pro Glu Glu Ala Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly
2240 2245 2250

Val Gln His Gln Phe Leu Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro
2255 2260 2265

Cys Gln Ile Cys Thr Cys Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr
2270 2275 2280

Pagina 34 di 36

Thr Gln Pro Cys Pro Thr Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys
2285 2290 2295

Glu Val Ala Arg Leu Arg Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu
2300 2305 2310

Tyr Glu Cys Val Cys Asp Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val
2315 2320 2325

Pro His Cys Glu Arg Gly Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly
2330 2335 2340

Glu Cys Arg Pro Asn Phe Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys
2345 2350 2355

Lys Arg Val Ser Pro Pro Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr
2360 2365 2370

Leu Arg Lys Thr Gln Cys Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn
2375 2380 2385

Cys Val Asn Ser Thr Val Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser
2390 2395 2400

Thr Ala Thr Asn Asp Cys Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro
2405 2410 2415

Asp Lys Val Cys Val His Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln
2420 2425 2430

Phe Trp Glu Glu Gly Cys Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu
2435 2440 2445

Asp Ala Val Met Gly Leu Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro
2450 2455 2460

Cys Glu Asp Ser Cys Arg Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu
2465 2470 2475

Gly Glu Cys Cys Gly Arg Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val
2480 2485 2490

Thr Gly Ser Pro Arg Gly Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val
2495 2500 2505

Gly Ser Gln Trp Ala Ser Pro Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu
2510 2515 2520

Pagina 35 di 36

Cys Val Arg Val Lys Glu Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val
2525 2530 2535

Ser Cys Pro Gln Leu Glu Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln
2540 2545 2550

Leu Ser Cys Lys Thr Ser Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu
2555 2560 2565

Arg Met Glu Ala Cys Met Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly
2570 2575 2580

Lys Thr Val Met Ile Asp Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val
2585 2590 2595

Gln Val Gly Val Ile Ser Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr
2600 2605 2610

Thr Cys Asn Pro Cys Pro Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr
2615 2620 2625

Gly Glu Cys Cys Gly Arg Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln
2630 2635 2640

Leu Arg Gly Gly Gln Ile Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu
2645 2650 2655

Gln Asp Gly Cys Asp Thr His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly
2660 2665 2670

Glu Tyr Phe Trp Glu Lys Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp
2675 2680 2685

Glu His Lys Cys Leu Ala Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro
2690 2695 2700

Gly Thr Cys Cys Asp Thr Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile
2705 2710 2715

Thr Ala Arg Leu Gln Tyr Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu
2720 2725 2730

Val Glu Val Asp Ile His Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys
2735 2740 2745

Ala Met Tyr Ser Ile Asp Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser

