

**TRADUZIONE**

**Brevetto Europeo n° EP 3 672 631**

Domanda di Brevetto Europeo n° 18762749.2

Depositata in data 22 Agosto 2018

5 Titolo: **“COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE CONTENENTI ANTICORPI ANTI-BETA AMILOIDE”**

Titolare: **Biogen MA Inc.**, con sede in 225 Binney Street, Cambridge, MA 02142 / STATI UNITI

\*\*\*

10 **DESCRIZIONE**

**Campo**

La presente domanda di brevetto riguarda in generale composizioni farmaceutiche comprendenti anticorpi anti-beta amiloide (A $\beta$ ) e loro usi.

**Contesto**

15 L'A $\beta$  è un peptide generato dal metabolismo della proteina precursore dell'amiloide (APP). Esistono diverse alloforme di peptidi A $\beta$  (*ad es.*, A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42). Questi peptidi monomerici hanno una tendenza variabile ad aggregarsi in dimeri e oligomeri di ordine superiore. Attraverso un processo di fibrillogenesi, gli oligomeri solubili possono passare in  
20 depositi insolubili aventi una struttura a foglio pieghettato  $\beta$ . Questi depositi sono anche indicati come placche amiloidi e sono composti prevalentemente da amiloide fibrillare [Hampel et al., Exp Neurol., 223(2):334-46 (2010); Gregory e Halliday, Neurotox Res., 7(1-2):29-41 (2005)]. Entrambe le forme solubile e fibrillare di A $\beta$  sembrano contribuire al processo patologico nei  
25 disturbi caratterizzati dalla deposizione di A $\beta$  come il morbo di Alzheimer (Alzheimer's disease, AD) [Meyer-Luehmann, J Neurosci., 29(40):12636-40 (2009); Hock, Dialogues Clin Neurosci., 5(1):27-33 (2003); Selkoe, Cold Spring Harb Perspect Biol., 3(7). pii: a004457 (2011)].

I pazienti affetti da AD che hanno titoli sierici elevati di anticorpi anti-A $\beta$  che riconoscono le placche amiloidi hanno tassi più lenti di declino cognitivo e disabilità rispetto ai pazienti che non hanno anticorpi anti-A $\beta$ . Inoltre, i pazienti che sviluppano titoli elevati di anticorpi anti-A $\beta$  mostrano un numero ridotto di placche A $\beta$  cerebrali e prestazioni cognitive  
5 migliorate valutate dopo un follow-up a lungo termine. Questi dati clinici suggeriscono che i pazienti affetti da AD trattati con anticorpi anti-A $\beta$  in un paradigma di immunoterapia passiva possono mostrare un ridotto deterioramento cognitivo, una minore densità di depositi cerebrali di A $\beta$  e tassi ridotti di deterioramento cognitivo.

L'anticorpo anti-A $\beta$ , BIIB037, è un anticorpo completamente umano comprendente una  
10 catena pesante IgG1 umana glicosilata e una catena leggera kappa umana. BIIB037 espresso in modo ricombinante si lega con elevata affinità apparente ad aggregati ad alto peso molecolare, presumibilmente fibrille, di A $\beta$  umano. Mediante immunoistochimica, BHB037 mostra un legame ad alta affinità con le placche A $\beta$  nel cervello umano di AD e nei tessuti cerebrali derivati da topi transgenici umani che esprimono APP. L'affinità e la specificità di BIIB037 per  
15 aggregati ad alto peso molecolare di A $\beta$  umano è stata confermata da immunoprecipitazione, immunoblotting e immunoistochimica. Nei topi transgenici AD Tg2576, il trattamento con BIIB037 determina livelli di farmaco misurabili nel cervello come valutato mediante ELISA. Dopo la somministrazione di BIIB037 nei topi Tg2576, l'immunoreattività per BIIB037 è stata osservata in associazione con depositi di amiloide cerebrale parenchimale e vascolare,  
20 suggerendo che BIIB037 entra nel parenchima cerebrale e si lega al suo bersaglio. Si ritiene che gli anticorpi anti-A $\beta$  somministrati per via sistemica come BIIB037 entrino nel cervello, si leghino ai depositi di A $\beta$  e inneschino la loro eliminazione dal cervello mediante meccanismi dipendenti dal recettore Fc. Si ipotizza che la rimozione mediata da anticorpi di A $\beta$  dal cervello riduca il carico di A $\beta$ , prevenendo così la disfunzione neuronale, rallentando la progressione  
25 della patologia e riducendo il tasso di declino cognitivo nell'AD.

## Sommario

La presente descrizione riguarda, in parte, composizioni farmaceutiche contenenti anticorpi anti-A $\beta$  come definito nelle rivendicazioni e il loro uso nel trattamento del morbo di Alzheimer.

5 In un aspetto, la descrizione presenta una composizione farmaceutica che comprende un anticorpo anti-beta amiloide (A $\beta$ ) a una concentrazione da 75 mg/mL a 225 mg/mL; cloridrato di arginina (Arg.HCl) a una concentrazione di 150 mM; metionina a una concentrazione di 10 mM; istidina a una concentrazione di 20 mM; e Polisorbato-80 (PS80) a una concentrazione dallo 0,01% allo 0,1%, in cui la composizione farmaceutica ha un pH da 5,2 a 6,2; in cui  
10 l'anticorpo anti-A $\beta$  comprende una catena pesante dell'immunoglobulina e una catena leggera dell'immunoglobulina, in cui la catena pesante comprende la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO:9 e la catena leggera comprende la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 10.

Qualsiasi riferimento a un metodo di trattamento praticato sul corpo umano o animale  
15 deve essere inteso come le composizioni per l'uso in tali metodi.

L'anticorpo anti-A $\beta$  comprende una catena pesante dell'immunoglobulina e un'immunoglobulina comprendente le sequenze amminoacidiche di BIIB037 come indicato in SEQ ID NO:9 e SEQ ID NO:10, rispettivamente. Le sei CDR di BIIB037 sono costituite dalle sequenze di amminoacidi esposte in SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:3; SEQ ID  
20 NO:4; SEQ ID NO:5; e SEQ ID NO:6.

La composizione comprende l'anticorpo anti-A $\beta$  o suo frammento legante A $\beta$  a una concentrazione da 75 mg/mL a 225 mg/mL. La composizione può comprendere l'anticorpo anti-A $\beta$  o suo frammento legante A $\beta$  a una concentrazione da 75 mg/mL a 165 mg/mL. In determinate forme di realizzazione, la composizione comprende l'anticorpo anti-A $\beta$  o il suo  
25 frammento legante A $\beta$  a una concentrazione di 150 mg/mL. In determinate forme di

realizzazione, la composizione comprende l'anticorpo anti-A $\beta$  o il suo frammento legante A $\beta$  a una concentrazione di 100 mg/mL.

La composizione comprende Arg.HCl a una concentrazione di 150 mM.

La composizione comprende inoltre polisorbato-80 (PS80) a una concentrazione dallo  
5 0,01% allo 0,1%. In alcune forme di realizzazione, la composizione comprende PS80 a una concentrazione dallo 0,03% allo 0,08%. In determinate forme di realizzazione, la composizione comprende PS80 a una concentrazione dello 0,05%.

La composizione comprende istidina a una concentrazione di 20 mM.

La composizione comprende metionina a una concentrazione di 10 mM.

10 La composizione può inoltre comprendere saccarosio. La composizione può comprendere saccarosio a una concentrazione dallo 0,01% al 5%. La composizione può comprendere saccarosio a una concentrazione dallo 1% al 4%. La composizione può comprendere saccarosio a una concentrazione del 3%.

La composizione ha un pH da 5,2 a 6,2. La composizione può avere un pH da 5,2 a 6,0.

15 La composizione può avere un pH da 5,3 a 5,7. La composizione può avere un pH di 5,5.

In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende l'anticorpo anti-A $\beta$  a una concentrazione di 150 mg/mL; Arg.HCl a una concentrazione di 150 mM; metionina a una concentrazione di 10 mM; istidina a una concentrazione di 20 mM; e PS80 a una concentrazione dello 0,05%. Questa composizione ha un pH da 5,2 a 6,2. In alcuni casi,  
20 questa composizione ha un pH compreso tra 5,2 e 6,0. In determinate forme di realizzazione, la composizione ha un pH compreso tra 5,3 e 5,7. In altre forme di realizzazione, la composizione ha un pH di 5,5.

In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende l'anticorpo anti-A $\beta$  a una concentrazione di 100 mg/mL; Arg.HCl a una concentrazione di 150 mM;  
25 metionina a una concentrazione di 10 mM; istidina a una concentrazione di 20 mM; e PS80 a

una concentrazione dello 0,05%. Questa composizione ha un pH da 5,2 a 6,2. In alcuni casi, questa composizione ha un pH compreso tra 5,2 e 6,0. In determinate forme di realizzazione, la composizione ha un pH compreso tra 5,3 e 5,7. In altre forme di realizzazione, la composizione ha un pH di 5,5.

5 L'anticorpo anti-A $\beta$  comprende una catena pesante dell'immunoglobulina e una catena leggera dell'immunoglobulina. La catena pesante comprende o è costituita dalla sequenza di SEQ ID NO:9 e la catena leggera comprende o è costituita dalla sequenza di SEQ ID NO:10.

In un altro aspetto, la descrizione presenta una composizione come definita nel presente documento per l'uso nel trattamento del morbo di Alzheimer in un soggetto umano che ne ha  
10 bisogno.

In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica deve essere somministrata per via sottocutanea al soggetto umano. In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica deve essere somministrata per via endovenosa al soggetto umano.

Salvo diversa definizione, tutti i termini tecnici e scientifici utilizzati nel presente  
15 contesto hanno lo stesso significato comunemente compreso dall'esperto della tecnica alla quale appartiene la presente invenzione. Sebbene metodi e materiali simili o equivalenti a quelli descritti nel presente contesto possano essere utilizzati nella pratica o nella prova della presente invenzione, di seguito sono descritti materiali e metodi esemplificativi. In caso di conflitto, prevarrà la presente domanda di brevetto, incluse le definizioni. I materiali, i metodi e gli  
20 esempi sono solo illustrativi.

Altri vantaggi e caratteristiche dell'invenzione saranno evidenti dalla seguente descrizione dettagliata e dalle rivendicazioni.

### **Breve descrizione dei disegni**

La FIG. 1 è un grafico a barre che rappresenta la %HMW per le formulazioni indicate  
25 conservate a 40 °C per 4 settimane.

La FIG. 2 è un grafico che mostra la %HMW per le formulazioni indicate conservate a 40 °C per 6 settimane.

La FIG. 3 è un grafico che mostra le tendenze %HMW al variare del pH se conservato a 25 °C + 60% di umidità relativa.

5 La FIG. 4 è un grafico che mostra le tendenze %HMW per eccipienti variabili quando conservati a 25 °C + 60% di umidità relativa.

La FIG. 5 è un grafico a barre che mostra la viscosità a 20 °C per le formulazioni.

La FIG. 6 è un grafico a barre che illustra i risultati %HMW per le formulazioni di polisorbato-80 dopo 72 ore a temperatura ambiente.

10 La FIG. 7 è un grafico che mostra l'effetto della combinazione di GSH e GSSG sulla stabilità delle formulazioni di Aducanumab a 25 °C e 60% di umidità relativa.

La FIG. 8 è un grafico che mostra l'effetto della combinazione di Cisteina e Cistina sulla stabilità delle formulazioni di Aducanumab a 25 °C e 60% di umidità relativa.

15 La FIG. 9 è un grafico che mostra che la forma ridotta di un eccipiente contenente tiolo ha lo stesso impatto sulla stabilità a 25 °C e 60% di umidità relativa della coppia redox.

La FIG. 10 è un grafico che illustra che la metionina fornisce benefici limitati quando combinata con GSH sulla stabilità delle formulazioni di Aducanumab a 25 °C e 60% di umidità relativa.

20 La FIG. 11 è una coppia di grafici che mostrano l'effetto di diverse concentrazioni di anticorpi e GSH sulla stabilità a 25 °C e 60% di umidità relativa.

La FIG. 12 è una coppia di grafici che mostrano che anche basse concentrazioni di GSH possono migliorare la stabilità di HMW.

La FIG. 13 è un grafico che mostra che il GSH a 4 mM ha lo stesso impatto sulla riduzione di HMW del GSH da 0,5 mM a 2 mM.

25 La FIG. 14 è una coppia di grafici che mostrano l'effetto dell'aumento della metionina

sui livelli di HMW a 25 °C (in alto) e 40 °C (in basso).

### **Descrizione dettagliata**

La presente domanda di brevetto fornisce composizioni farmaceutiche che comprendono un anticorpo anti-beta amiloide (A $\beta$ ) a una concentrazione da 75 mg/mL a 225  
5 mg/mL; cloridrato di arginina (Arg.HCl) a una concentrazione di 150 mM; metionina a una concentrazione di 10 mM; istidina a una concentrazione di 20 mM; e Polisorbato-80 (PS80) a una concentrazione dallo 0,01% allo 0,1%, in cui la composizione farmaceutica ha un pH da 5,2 a 6,2; in cui l'anticorpo anti-A $\beta$  comprende una catena pesante dell'immunoglobulina e una catena leggera dell'immunoglobulina, in cui la catena pesante comprende la sequenza  
10 amminoacidica esposta in SEQ ID NO:9 e la catena leggera comprende la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 10; e il loro uso nel trattamento del morbo di Alzheimer.

### **Beta amiloide (A $\beta$ o Abeta)**

Il peptide A $\beta$  è un importante fattore di rischio e ha un ruolo centrale nell'insorgenza e nella progressione del morbo di Alzheimer. L'A $\beta$  viene prodotto in individui normali, ma in  
15 alcune circostanze questa molecola si aggrega portando alla progressione della malattia.

A $\beta$  denota peptidi da 36 a 43 amminoacidi che sono coinvolti nella formazione delle placche amiloidi presenti nel cervello dei pazienti affetti dal morbo di Alzheimer. Placche simili compaiono in alcune varianti della demenza da corpi di Lewy e nella miosite da corpi inclusi. L'A $\beta$  forma anche gli aggregati che rivestono i vasi sanguigni cerebrali nell'angiopatia amiloide  
20 cerebrale.

I peptidi A $\beta$  sono formati dalla scissione della proteina precursore dell'amiloide (APP) da parte degli enzimi beta secretasi e gamma secretasi. Le molecole A $\beta$  possono aggregarsi per formare oligomeri solubili flessibili che possono esistere in diverse forme. Esistono diverse alloforme di peptidi A $\beta$ , A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42. Di seguito viene fornita la sequenza amminoacidica del  
25 peptide  $\beta$  amiloide umano (1-40):

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO:11) La  
sequenza amminoacidica del peptide beta amiloide umano (1-42) è fornita di seguito:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO:12)

Si ritiene che le forme oligomeriche solubili del peptide A $\beta$  siano agenti causali nello sviluppo  
5 del morbo di Alzheimer.

### **Anticorpi anti-A $\beta$**

L'anticorpo anti-A $\beta$  utilizzato nelle composizioni e nei metodi descritti nel presente  
documento comprende una catena pesante dell'immunoglobulina e una catena leggera  
dell'immunoglobulina che comprende le sequenze amminoacidiche di un anticorpo indicato  
10 come "BIIB037" o come aducanumab come esposto in SEQ ID NO :9 e SEQ ID NO:10,  
rispettivamente.

BIIB037 è un anticorpo completamente umano comprendente una catena pesante IgG1  
umana glicosilata e una catena leggera kappa umana. BIIB037 è costituito dalla sequenza di  
amminoacidi a catena pesante matura rappresentata in SEQ ID NO:9 e dalla sequenza di  
15 amminoacidi a catena leggera matura rappresentata in SEQ ID NO:10.

La VH e la VL di BIIB037 hanno sequenze amminoacidiche che sono identiche alla  
sequenza amminoacidica della VH e della VL dell'anticorpo NI-101.12F6A descritto nel  
brevetto U.S. n. 8,906,367 (*si vedano le Tabelle 2-4*). In particolare, l'anticorpo BIIB037 ha un  
dominio di legame dell'antigene comprendente le regioni variabili VH e VL illustrate nella  
20 **Tabella 1** (VH) e **nella Tabella 2** (VL), le corrispondenti regioni determinanti la  
complementarità (CDR) illustrate nella **Tabella 3** e le catene pesanti e leggere illustrate nella  
**Tabella 4** (H) e nella **Tabella 5** (L).

**Tabella 1:** sequenze amminoacidiche della regione V<sub>H</sub> dell'anticorpo anti-A $\beta$  BIIB037  
[VH CDR (definizione di Kabat) sottolineate].

Sequenza di catena pesante variabile
QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFAFS <u>SYGMHWVRQA</u> PGKGLEWVAV <u>IWFDGTRKYY</u> <u>IDSVKGRFTI</u> SRDNSKNTLY LQMNTRLRAED TAVYYCARDR <u>GIGARRGPYY</u> MDVWGKGTTV TVSS (SEQ ID NO:7)

**Tabella 2:** sequenze amminoacidiche della regione V<sub>L</sub> dell'anticorpo anti-A $\beta$  BIIB037

[VL CDR (definizione di Kabat) sottolineate].

Sequenza variabile di catene leggere (kappa o lambda)
DIQMTQSPSS ISASVGRVT ITCRASQIS <u>SYLNWYQQK</u> GKAPKLLIYA <u>ASSLQSGVPS</u> RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQO <u>SYSTPLTFGG</u> GTKVEIKR (SEQ ID NO:8)

**Tabella 3:** denominazione delle sequenze proteiche CDR nella nomenclatura di Kabat delle regioni V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> dell'anticorpo anti-A $\beta$  BIIB037.

CDR	Catena pesante variabile	Catena leggera variabile
CDR1	SYGMH (SEQ ID NO:1)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4)
CDR2	VIWFDGTRKYYTDSVKG	AASSLQS
	(SEQ ID NO:2)	(SEQ ID NO:5)
CDR3	DRGIGARRGPYYMDV (SEQ ID NO:3)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO:6)

5 La sequenza amminoacidica della catena pesante matura di BIIB037 viene fornita nella **Tabella 4** di seguito.

**Tabella 4:** sequenze amminoacidiche della catena pesante dell'anticorpo anti-A $\beta$  BIIB037 [CDR a catena pesante (definizione di Kabat) sottolineate].

Sequenza di catene pesanti
QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFAFS <u>SYGMHWVRQA</u> PGKGLEWVAV <u>IWFDGTRKYY</u> TDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNTRLRAED TAVYYCARDR <u>GIGARRGPYY</u> MDVWGKGTTV TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVETFPV LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK RVEPKSCDKT HTCPPCPAPE LGGPSVFLF PPKPKDITLM SRTPEVTCVV VDVSHEDEPEV KFNWYVDGVE VHNAKITKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLEQDW LNCKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TTPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG (SEQ ID NO:9)

La sequenza amminoacidica della catena leggera matura di BIIB037 viene fornita nella **Tabbella 5** di seguito.

**Tabella 5:** sequenze amminoacidiche della catena leggera dell'anticorpo anti-A $\beta$  BIIB037 [CDR a catena leggera (definizione di Kabat) sottolineate].

Sequenza di catene leggere			
DIQMTQSPSS	LSASVGRVT	ITCRASQIS	SYLNWYQCKP
ASSLQSGVPS	RFGSGSGTD	FTLTISLQP	EDFATYYCQQ
GTKVEIKRTV	AAPSVFIFPP	SDEQLKSGTA	SVVCLLNIFY
DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSSTLT	LSKADYKHK
LSSPVTKSFN	RGEC	(SEQ ID NO:10)	

5 L'anticorpo anti-A $\beta$  o il suo frammento legante l'A $\beta$  può legarsi selettivamente a un peptide che comprende o è costituito dagli amminoacidi 1-16 dell'A $\beta$  umano

L'anticorpo anti-A $\beta$  o i frammenti leganti l'A $\beta$  possono legarsi selettivamente a un peptide che comprende o è costituito dagli amminoacidi 3-6 dell'A $\beta$  umano.

10 Anticorpi, come BIIB037, possono essere prodotti, ad esempio, preparando ed esprimendo geni sintetici che codificano le sequenze di amminoacidi citate o mutando geni della linea germinale umana per fornire un gene che codifichi le sequenze di amminoacidi citate. Inoltre, questo anticorpo e altri anticorpi anti-A $\beta$  possono essere prodotti, ad esempio, utilizzando uno o più dei seguenti metodi.

#### Metodi di produzione di anticorpi

15 Gli anticorpi anti-A $\beta$  possono essere prodotti in cellule batteriche o eucariote. Alcuni anticorpi, *ad esempio* i Fab, possono essere prodotti in cellule batteriche, *ad esempio le cellule di E. coli*. Gli anticorpi possono anche essere prodotti in cellule eucariotiche come linee cellulari trasformate (ad es., CHO, 293E, COS). Inoltre, gli anticorpi (*ad es.*, scFv) possono essere espressi in una cellula di lievito come *Pichia* [si vedano, *ad es.*, Powers et al., J Immunol Methods. 251:123-35 (2001)], *Hanseula* o *Saccharomyces*. Per produrre l'anticorpo di interesse, viene costruito un polinucleotide che codifica l'anticorpo, introdotto in un vettore di espressione

20

e quindi espresso in cellule ospiti adatte. I polinucleotidi che codificano un anticorpo anti-A $\beta$  comprendente VH e/o VL, HC e/o LC degli anticorpi A $\beta$  qui descritti sarebbero facilmente immaginabili dall'esperto della tecnica ordinaria. Le tecniche standard di biologia molecolare sono utilizzate per preparare il vettore di espressione ricombinante, trasfettare le cellule ospiti, 5 selezionare i trasformanti, coltivare le cellule ospiti e recuperare l'anticorpo.

Se gli anticorpi anti-A $\beta$  devono essere espressi in cellule batteriche (*ad esempio, E. coli*), il vettore di espressione dovrebbe avere caratteristiche che consentano l'amplificazione del vettore nelle cellule batteriche. Inoltre, quando *E. coli* come JM109, DH5a, HB101 o XL1-Blue viene utilizzato come ospite, il vettore deve avere un promotore, ad esempio un promotore lacZ 10 (Ward et al., 341:544-546 (1989), promotore araB [Meglio et al., Science, 240:1041-1043 (1988)], o promotore T7 che può consentire un'espressione efficiente in *E. coli*. Esempi di tali vettori includono, ad esempio, vettori della serie M13, vettori della serie pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress system" (QIAGEN), pEGFP e pET (quando viene utilizzato questo vettore di espressione, l'ospite è preferibilmente BL21 che 15 esprime la T7 RNA polimerasi). Il vettore di espressione può contenere una sequenza di segnali per la secrezione di anticorpi. Per la produzione nel periplasma di *E. coli*, la sequenza del segnale *pelB* [ Lei et al., J. Bacteriol., 169: 4379 (1987 )] può essere usato come sequenza di segnali per la secrezione di anticorpi. Per l'espressione batterica, si possono usare metodi di cloruro di calcio o metodi di elettroporazione per introdurre il vettore di espressione nella 20 cellula batterica.

Se l'anticorpo deve essere espresso in cellule animali come le cellule CHO, COS e NIH3T3, il vettore di espressione include un promotore necessario per l'espressione in queste cellule, per esempio, un promotore SV40 [ Mulligan et al., Nature, 277:108 (1979)], promotore MMLV-LTR, promotore EF1 $\alpha$  [Mizushima et al., Nucleic Acids Res., 18:5322 (1990)], o 25 promotore CMV. Oltre alla sequenza di acido nucleico che codifica l'immunoglobulina o il suo

dominio, i vettori di espressione ricombinante possono trasportare sequenze aggiuntive, come sequenze che regolano la replicazione del vettore nelle cellule ospiti (ad esempio, origini della replicazione) e geni marcatori selezionabili. Il gene marker selezionabile facilita la selezione di cellule ospite in cui è stato introdotto il vettore (si vedano ad esempio i brevetti U.S. nn. 5 4,399,216, 4,634,665 e 5,179,017). Ad esempio, tipicamente il gene marcatore selezionabile conferisce resistenza ai farmaci, come G418, igromicina o metotrexato, su una cellula ospite in cui è stato introdotto il vettore. Esempi di vettori con marcatori selezionabili includono pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV e pOP13.

Gli anticorpi possono essere prodotti in cellule di mammifero. Cellule ospiti di 10 mammiferi esemplificativi per esprimere un anticorpo includono l'ovaio di criceto cinese (cellule CHO) (comprese le cellule *dhfr*-CHO, descritte in Urlaub e Chasin (1980) proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, utilizzato con un marcatore selezionabile DHFR, ad esempio, come descritto in Kaufmann e Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), cellule renali embrionali umane 293 (ad es., 293, 293E, 293T), cellule COS, cellule NIH3T3, linee cellulari linfocitarie, 15 ad es., cellule di mieloma NS0 e cellule SP2, e una cellula di un animale transgenico, ad es., un mammifero transgenico. Ad esempio, la cellula è una cellula epiteliale mammaria.

In un sistema esemplificativo per l'espressione anticorpale, un vettore di espressione ricombinante che codifica sia la catena pesante dell'anticorpo che la catena leggera dell'anticorpo di un anticorpo anti-A $\beta$  (ad esempio, BIIB037) viene introdotto nelle cellule *dhfr*- 20 CHO mediante trasfezione mediata da fosfato di calcio. All'interno del vettore di espressione ricombinante, i geni di catena pesante e leggera dell'anticorpo sono ciascuno funzionalmente legati a elementi regolatori di potenziatori/promotori (ad esempio derivati da SV40, CMV, adenovirus e simili, come un elemento regolatore del potenziatore di CMV/promotore di AdMLP o un elemento regolatore del potenziatore di SV40/promotore di AdMLP) per condurre 25 elevati livelli di trascrizione dei geni. Il vettore di espressione ricombinante porta anche un gene

*DHFR*, che consente la selezione di cellule CHO che sono state trasfettate con il vettore utilizzando selezione/amplificazione con metotrexato. Le cellule ospite di trasformatante scelte sono coltivate per consentire l'espressione delle catene pesante e leggera dell'anticorpo e l'anticorpo viene recuperato dal terreno di coltura.

5           Gli anticorpi possono anche essere prodotti da un animale transgenico. Ad esempio, il brevetto U.S. 5.849.992 descrive un metodo per esprimere un anticorpo nella ghiandola mammaria di un mammifero transgenico. Viene costruito un transgene che include un promotore specifico per il latte e acidi nucleici codificanti l'anticorpo di interesse e una sequenza di segnale per la secrezione. Il latte prodotto dalle femmine di tali mammiferi  
10 transgenici include, secreto al suo interno, l'anticorpo di interesse. L'anticorpo può essere purificato dal latte, oppure utilizzato direttamente per alcune applicazioni.

          Gli anticorpi della presente descrizione possono essere isolati dall'interno o dall'esterno (come un mezzo) della cellula ospite e purificati come anticorpi sostanzialmente puri e omogenei. I metodi di isolamento e purificazione comunemente usati per la purificazione di  
15 anticorpi possono essere usati per l'isolamento e la purificazione di anticorpi e non sono limitati a nessun metodo specifico. Gli anticorpi possono essere isolati e purificati selezionando e combinando opportunamente, ad esempio, cromatografia su colonna, filtrazione, ultrafiltrazione, salatura, precipitazione con solvente, estrazione con solvente, distillazione, immunoprecipitazione, elettroforesi su gel di poliacrilammide SDS, focalizzazione isoelettrica,  
20 dialisi e ricristallizzazione. La cromatografia comprende, ad esempio, la cromatografia di affinità, la cromatografia a scambio ionico, la cromatografia idrofobica, la filtrazione su gel, la cromatografia in fase inversa e la cromatografia ad adsorbimento (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). La cromatografia può essere eseguita utilizzando  
25 la cromatografia in fase liquida come HPLC e FPLC. Le colonne utilizzate per la cromatografia

di affinità includono la colonna A della proteina e la colonna G della proteina. Esempi di colonne che utilizzano la colonna di proteina A includono Hyper D, POROS e Sepharose FF (GE Healthcare Biosciences). La presente descrizione include anche anticorpi che sono altamente purificati usando questi metodi di purificazione.

## 5 Composizioni anticorpali farmaceutiche anti-A $\beta$

La composizione anticorpale farmaceutica anti-A $\beta$  comprende anticorpi anti-A $\beta$  a una concentrazione da 75 mg/mL a 225 mg/mL. La composizione anticorpale anti-A $\beta$  può comprendere anticorpi anti-A $\beta$  a una concentrazione da 75 mg/mL a 165 mg/mL. La composizione anticorpale anti-A $\beta$  può comprendere anticorpi anti-A $\beta$  a una concentrazione da 100 mg/mL a 225 mg/mL. La composizione anticorpale anti-A $\beta$  può comprendere anticorpi anti-A $\beta$  a una concentrazione da 125 mg/mL a 225 mg/mL. La composizione anticorpale anti-A $\beta$  può comprendere anticorpi anti-A $\beta$  a una concentrazione da 125 mg/mL a 175 mg/mL. La composizione anticorpale anti-A $\beta$  può comprendere anticorpi anti-A $\beta$  a una concentrazione di 225 mg/mL. La composizione anticorpale anti-A $\beta$  può comprendere anticorpi anti-A $\beta$  a una concentrazione di 200 mg/mL. In alcuni casi, la composizione anticorpale anti-A $\beta$  comprende anticorpi anti-A $\beta$  a una concentrazione di 175 mg/mL. In alcuni casi, la composizione anticorpale anti-A $\beta$  comprende anticorpi anti-A $\beta$  a una concentrazione di 150 mg/mL. La composizione anticorpale anti-A $\beta$  può comprendere anticorpi anti-A $\beta$  a una concentrazione di 125 mg/mL. In alcuni casi, la composizione anticorpale anti-A $\beta$

Una composizione farmaceutica comprendente un anticorpo anti-A $\beta$  qui descritto può essere in una qualsiasi di una varietà di forme. Questi includono, ad esempio, soluzioni liquide (ad esempio, soluzioni iniettabili e infusibili), dispersioni o sospensioni. La forma preferita può dipendere dalla modalità di somministrazione e dall'applicazione terapeutica desiderate. Una composizione farmaceutica qui descritta può essere sotto forma di una soluzione sterile iniettabile o infusibile.

Le soluzioni iniettabili sterili possono essere preparate incorporando un anticorpo qui descritto nella quantità richiesta con uno o una combinazione di ingredienti, seguita da sterilizzazione filtrata. Generalmente, le dispersioni sono preparate mediante incorporazione di un anticorpo descritto nel presente contesto in un veicolo sterile che contiene un mezzo di dispersione basico e gli altri ingredienti necessari. Nel caso di polveri sterili per la preparazione di soluzioni iniettabili sterili, i metodi di preparazione esemplificativi sono l'essiccazione sottovuoto e la crioessiccazione, che produce una polvere di un anticorpo descritto nel presente contesto più qualsiasi ingrediente aggiuntivo desiderato da una sua soluzione precedentemente sottoposta a filtraggio sterile. La corretta fluidità di una soluzione può essere mantenuta ad esempio mediante l'uso di un rivestimento come la lecitina, mediante il mantenimento della granulometria necessaria in caso di dispersione e mediante l'uso di tensioattivi.

Le composizioni anticorpali farmaceutiche anti-A $\beta$  possono inoltre comprendere uno o più eccipienti.

L'eccipiente può abbassare/ridurre l'aggregazione e/o la viscosità dell'anticorpo nella composizione rispetto all'aggregazione e/o la viscosità dell'anticorpo nella composizione farmaceutica senza tale eccipiente. Tale eccipiente è (L-)arginina cloridrato.

L'arginina [vale a dire, (L-). cloridrato di arginina) è inclusa nella composizione a una concentrazione di 150 mM.

A volte, le soluzioni contenenti arginina sviluppano particelle visibili dopo l'incubazione a temperatura ambiente o temperature superiori (*ad esempio*, 40 °C). L'aggiunta di saccarosio può ridurre o impedire la formazione di particelle visibili. Inoltre, il saccarosio può abbassare i conteggi delle particelle sub visibili. La composizione anticorpale anti-A $\beta$  può comprendere saccarosio a una concentrazione dallo 0,05% al 5%, dallo 0,05% al 4%, dallo 0,05% al 3%, dall'1% al 5%, dall'1% al 4%, dall'1% al 3%, dal 2% al 5%, dal 2% al 4% o dal 2% al 3%.

La composizione anticorpale anti-A $\beta$  può comprendere saccarosio a una concentrazione dello

0,5%, dell'1%, dell'1,5%, del 2%, del 2,5%, del 3%, del 3,5%, del 4%, del 4,5% o del 5%. La composizione anticorpale anti-Ap può comprendere saccarosio a una concentrazione del 3%. La composizione anticorpale anti-Ap può comprendere saccarosio a una concentrazione del 1%.

Le composizioni anticorpali anti-A $\beta$  comprendono metionina a una concentrazione di  
5 10 mM.

La produzione di prodotti anticorpali è un processo complesso che può comportare diverse fasi come, ad esempio, sostanza farmaceutica e formulazione di massa, filtrazione, spedizione, raggruppamento, riempimento, liofilizzazione, ispezioni, confezionamento e conservazione. Durante queste fasi, gli anticorpi possono essere sottoposti a molte diverse forme  
10 di stress, ad esempio agitazione, temperatura, esposizione alla luce e ossidazione. Questi tipi di stress possono portare alla denaturazione e all'aggregazione dell'anticorpo, che compromettono la qualità del prodotto e possono anche portare alla perdita di un lotto di produzione. L'agitazione è uno dei comuni stress fisici a cui sono sottoposti gli anticorpi terapeutici durante il processo di produzione. L'agitazione si verifica, ad esempio, durante la miscelazione,  
15 l'ultrafiltrazione/diafiltrazione, il pompaggio, la spedizione e il riempimento. Per proteggere la composizione anticorpale dallo stress indotto dall'agitazione, la composizione può includere un polisorbato. La composizione comprende polisorbato-80 a una concentrazione dallo 0,01% allo 0,1% e può comprendere polisorbato-80 a una concentrazione dallo 0,01% allo 0,5%, dallo 0,01% allo 0,1%, dallo 0,01% allo 0,09%, dallo 0,01% allo 0,08%, 0,01 % allo 0,07%, dallo 0,01% allo  
20 0,06%, dallo 0,01% allo 0,05%, dallo 0,01% allo 0,04% o dallo 0,01% allo 0,03%. La composizione può comprendere polisorbato-80 a una concentrazione dallo 0,02% allo 0,08%. La composizione può comprendere polisorbato -80 a una concentrazione dello 0,01%, dello 0,02%, dello 0,03%, dello 0,04%, dello 0,05%, dello 0,06%, dello 0,07%, dello 0,08%, dello 0,09% o dello 0,1%. In una forma di realizzazione particolare, la composizione comprende  
25 polisorbato-80 a una concentrazione dello 0,05%.

Qualsiasi composizione anticorpale beneficia di un tampone che fornisce una buona capacità tamponante. La composizione anticorpale comprende istidina a una concentrazione di 20 mM come agente tamponante.

Il pH della composizione anticorpale può essere compreso tra 5,2 e 6,2. Il pH delle  
5 composizioni anticorpali può essere 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1 o 6,2. In una forma di realizzazione specifica, il pH della composizione anticorpale è 5,5.

Le composizioni A $\beta$  possono comprendere cloridrato di L-arginina (150 mM), metionina (10 mM), istidina (20 mM) e PS80 (0,05%) e hanno un pH da 5,2 a 6,2. Le composizioni A $\beta$  possono comprendere cloridrato di L-arginina (150 mM), metionina (10 mM),  
10 istidina (20 mM) e PS80 (0,05%) e hanno un pH di 5,5. Le composizioni A $\beta$  possono comprendere L-arginina cloridrato (150 mM), metionina (10 mM) istidina (20 mM), PS80 (0,05%) e saccarosio (fino al 3%) e possono avere un pH da 5,2 a 6,2. In tutti questi casi, l'anticorpo anti-A $\beta$  è presente a una concentrazione da 100 mg/mL a 165 mg/mL. In un caso, l'anticorpo anti-A $\beta$  è presente a una concentrazione di 150 mg/mL. In un caso, l'anticorpo anti-  
15 A $\beta$  è presente a una concentrazione di 100 mg/mL.

In alcuni casi, la composizione anti-A $\beta$  può comprendere un antiossidante contenente tiolo [ad es. glutatione ridotto (GSH), glutatione ossidato (GSSG), GSH + GSSG, cisteina, cistina, cisteina + cistina] a una concentrazione da 0,02 mM a 4 mM (ad es., 0,02, 0,03, 0,05, 0,06, 0,08, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9,  
20 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9 o 4,0 mM). Tali antiossidanti contenenti tiolo possono scindere legami disolfuro sfavorevoli o con ponte errato e promuovere la formazione di legami disolfuro favorevoli o a ponte appropriato. Questo comporta la stabilizzazione della conferma nativa dell'anticorpo o del suo frammento e rallenta le velocità di aggregazione. Le proprietà antiossidanti di queste molecole possono  
25 rallentare i processi ossidativi che portano all'aggregazione. In alcuni casi, la composizione può

comprendere GSH a una concentrazione di 0,4 mM. In alcuni casi, la composizione può comprendere GSSG a una concentrazione di 0,2 mM. In alcuni casi, la composizione può comprendere GSH a una concentrazione di 0,4 mM e GSSG a una concentrazione di 0,2 mM. In alcuni casi, la composizione può comprendere GSH a una concentrazione di 4 mM e GSSG a una concentrazione di 2 mM. In alcuni casi, la composizione può comprendere GSH a una concentrazione di 2 mM e GSSG a una concentrazione di 1 mM. In alcuni casi, la composizione può comprendere cisteina a una concentrazione di 0,4 mM. In alcuni casi, la composizione può comprendere cistina a una concentrazione di 0,2 mM. In alcuni casi, la composizione può comprendere cisteina a una concentrazione di 0,4 mM e cistina a una concentrazione di 0,2 mM.

10 Le composizioni A $\beta$  possono comprendere cloridrato di L-arginina (150 mM), metionina (10 mM), istidina (20 mM), un antiossidante contenente tiolo come GSH, GSSG, GSH e GSSG, cisteina, cistina o cisteina e cistina (ad es., da 0,02 mM a 4 mM) e PS80 (0,05%) e può avere un pH compreso tra 5,2 e 6,2. Le composizioni A $\beta$  possono comprendere cloridrato di L-arginina (150 mM), metionina (10 mM), istidina (20 mM), un antiossidante contenente tiolo come GSH, GSSG, GSH e GSSG, cisteina, cistina o cisteina e cistina (ad esempio, da 0,02 mM a 4 mM) e PS80 (0,05%) e può avere un pH di 5,5. Le composizioni A $\beta$  possono comprendere L-arginina cloridrato (150 mM), metionina (10 mM), istidina (20 mM), PS80 (0,05%), un antiossidante contenente tiolo come GSH, GSSG, GSH e GSSG, cisteina, cistina, o cisteina e cistina (ad es., da 0,02 mM a 4 mM) e saccarosio (fino al 3%), e può avere un pH  
15  
20 compreso tra 5,2 e 6,2. In tutti questi casi, l'anticorpo anti-A $\beta$  è presente a una concentrazione da 100 mg/mL a 165 mg/mL. In un caso, l'anticorpo anti-A $\beta$  è presente a una concentrazione di 150 mg/mL. In un caso, l'anticorpo anti-A $\beta$  è presente a una concentrazione di 100 mg/mL.

L'anticorpo anti-A $\beta$  o un suo frammento legante A $\beta$  della composizione comprende una VH e una VL comprendenti SEQ ID NO: 9 e 10, rispettivamente. In una forma di realizzazione,  
25 la composizione ha un pH di 5,5 e comprende BIIB037 a una concentrazione di 150 mg/mL, L-

arginina cloridrato a una concentrazione di 150 mM, metionina a una concentrazione di 10 mM, polisorbato-80 a una concentrazione dello 0,05% e istidina a una concentrazione di 20 mM (16,2 mM di L-istidina HCl monoidrato, 3,8 mM di L-istidina a base libera). La composizione può inoltre comprendere un antiossidante contenente tiolo (per esempio, GSH, GSSG, GSH +  
5 GSSG, cisteina, cistina, cisteina + cistina) a una concentrazione da 0,02 mM a 4 mM. La composizione può comprendere inoltre saccarosio a una concentrazione dallo 0,01% al 3%.

L'antiossidante contenente tiolo può essere GSH a una concentrazione di 0,4 mM. L'antiossidante contenente tiolo può essere GSH ad una concentrazione di 0,4 mM e GSSG a una concentrazione di 0,2 mM. L'antiossidante contenente tiolo può essere GSH ad una  
10 concentrazione di 4 mM e GSSG a una concentrazione di 2 mM. L'antiossidante contenente tiolo può essere GSH ad una concentrazione di 2 mM e GSSG a una concentrazione di 1 mM. L'antiossidante contenente tiolo può essere cisteina a una concentrazione di 0,4 mM. L'antiossidante contenente tiolo può essere cisteina a una concentrazione di 0,4 mM e cistina a una concentrazione di 0,2 mM.

## 15 Usi medici

BIIB037 riconosce le forme aggregate di A $\beta$ , incluse le placche. Studi di caratterizzazione *in vitro* hanno stabilito che l'anticorpo BIIB037 riconosce un epitopo conformazionale presente negli aggregati A $\beta$ , il cui accumulo si ritiene sia alla base dello sviluppo e della progressione della malattia di Alzheimer (AD). Studi farmacologici *in vivo*  
20 indicano che una versione chimerica IgG2a murina dell'anticorpo (ch12F6A) con proprietà simili riduce significativamente il carico di placca amiloide nel cervello dei topi Tg2576 invecchiati, un modello murino di AD. La riduzione dell'amiloide parenchimale non è stata accompagnata da un cambiamento dell'amiloide vascolare, come è stato riportato per alcuni anticorpi anti-A $\beta$ .

25 Le composizioni qui descritte sono utili nel trattare l'accumulo anormale o la

deposizione di Ap nel sistema nervoso centrale di un soggetto umano che ne ha bisogno. Le composizioni qui descritte sono utili anche nel trattamento di un lieve deterioramento cognitivo in un soggetto umano che ne ha bisogno. Come usati qui, i termini "trattare", "trattando" o "trattamento" significano generalmente ottenere un effetto farmacologico e/o fisiologico desiderato.

In determinate forme di realizzazione, le composizioni qui descritte sono per l'uso nel trattamento dell'AD in un soggetto umano che ne ha bisogno. Le composizioni qui descritte possono anche essere utili nella prevenzione dell'AD in un soggetto umano che ne ha bisogno.

Le composizioni qui descritte possono essere utilizzate per: (a) impedire che si verifichi l'AD in un soggetto che può essere predisposto all'AD, ma a cui non è stata ancora diagnosticata l'AD; (b) inibire l'AD, ad esempio arrestandone lo sviluppo; (c) alleviare l'AD, ad esempio provocando la regressione dell'AD; o (d) prolungare la sopravvivenza rispetto alla sopravvivenza attesa se non si riceve il trattamento.

A un soggetto umano che ne ha bisogno viene somministrata una quantità o dose terapeuticamente efficace dell'anticorpo anti-A $\beta$  o del suo frammento legante A $\beta$ . Una quantità terapeuticamente efficace si riferisce alla quantità di anticorpo sufficiente a migliorare un sintomo o una condizione associata all'AD. L'efficacia terapeutica e la tossicità dell'anticorpo possono essere determinate mediante procedure farmaceutiche standard. Idealmente, l'anticorpo viene impiegato in una quantità sufficiente a ripristinare il comportamento normale e/o le proprietà cognitive in caso di malattia di Alzheimer, o almeno ritardare o impedire la progressione dell'AD nel paziente.

In alcune forme di realizzazione, la composizione comprendente l'anticorpo anti-A $\beta$  o il suo frammento legante A $\beta$  viene somministrata per via endovenosa al soggetto umano. In alcune forme di realizzazione, la composizione che comprende l'anticorpo anti-A $\beta$  o il suo frammento legante l'A $\beta$  viene somministrata per via sottocutanea al soggetto umano.

I seguenti sono esempi della pratica dell'invenzione.

**Esempi**

**Esempio 1: pH e tampone sottoposti a screening per una formulazione ottimale**

Le seguenti formulazioni sono state preparate e sottoposte a screening per determinare il

5 tampone e il pH ottimali.

**Tabella 6:** formulazioni per lo screening del pH e del tampone

<b>Tampone</b>	<b>pH</b>	<b>Eccipienti</b>	<b>Concentrazione proteica</b>
20 mM di acetato	4,5	150 mM di L-arginina HCl polisorbato-80 allo 0,05%	155 - 165 mg / mL
	5,0		
	5,5		
20 mM di succinato	4,5		
	5,0		
	5,5		
	6,0		
20 mM di istidina	5,5		
	6,0		
	6,5		
20 mM di citrato	5,0		
	5,5		
	6,0		
	6,5		

Le formulazioni sono state conservate a 40 °C + 75% di umidità relativa (UR) per 4 settimane (Figura 1).

***Conclusioni:***

- 10
- 1) Il tampone di istidina ha mostrato la variazione più bassa nella percentuale di specie ad alto peso molecolare (% HMW) rispetto ai tamponi di acetato, succinato e citrato.
  - 2) La tendenza è stata coerente nell'intervallo di pH compreso tra 5,5 e 6,5.

**Esempio 2: arginina come eccipiente ottimale per il controllo di HMW**

Le seguenti formulazioni sono state preparate per determinare l'uno o più eccipienti stabilizzati ottimali. La maggior parte contiene L-Arginina HCl, da sola o in combinazione con un altro eccipiente. Due formulazioni non contenevano arginina e contenevano solo uno zucchero (saccarosio o trealosio).

5

**Tabella 7:** formulazioni per lo screening degli eccipienti

<b>Eccipiente (tutti contengono 20 mM di istidina e 0,05% di polisorbato-80)</b>	<b>pH</b>	<b>Concentrazione proteica</b>
150 mM di L-Arginina HCl	6,0	220 - 230 mg/mL
150 mM di L-Arginina HCl	5,5	
100 mM di L-Arginina HCl	5,5	
100 mM di L-arginina HCl + 3% saccarosio	5,5	
100 mM di L-arginina HCl + 3% saccarosio	6,0	
100 mM di L-Arginina HCl + 50 mM di NaCl	5,5	
75 mM di L-Arginina HCl + 75 mM di glutammato	5,5	
150 mM di L-Arginina HCl + 10 mM di metionina	5,5	
150 mM di L-Arginina HCl + 10 mM di metionina	6,0	
300 mM di saccarosio	5,5	
300 mM di trealosio	5,5	
50 mM di L-arginina HCl + 4,5% saccarosio	5,5	

Le formulazioni sono state conservate a 40 °C + 75% RH e testate per %HMW per 6 settimane (**Figura 2**).

**Conclusioni:**

1) Le formulazioni contenenti arginina (linee continue) hanno ottenuto risultati migliori rispetto alle formulazioni senza arginina (linee tratteggiate).

10

2) La combinazione arginina + metionina (le due linee continue più in basso nel grafico) ha ottenuto risultati migliori rispetto all'arginina da sola e all'arginina in combinazione con altri eccipienti.

3) Le formulazioni preparate sia a pH 5,5 che a 6,0 hanno sempre dato risultati migliori

a pH 5,5.

**Esempio 3: robustezza della formulazione per pH e concentrazione proteica**

È stata eseguita un'ulteriore ottimizzazione della formulazione preparando varie formulazioni basate su una formulazione centrale (Tabella 8) e vagliando vari attributi di qualità.

**Tabella 8:** ottimizzazioni delle formulazioni per lo screening (le variazioni dalla formulazione centrale sono evidenziate in grigio)

Variazione della formulazione	[Proteina] mg/mL	pH	Tampone (20mM)	Arginina (mM)	Metionina (mM)	Saccarosio (%)	PS-80 (%)
Formulazione centrale	220	5.7	His	150	10		0.05
Centro a 165mg/mL	165	5.7	His	150	10		0.05
Centro a 280mg/mL	280	5.7	His	150	10		0.05
Centro a pH 5.2	220	5.2	His	150	10		0.05
Centro a pH 6.2	220	6.2	His	150	10		0.05
Centro con 100 mM di arginina	220	5.7	His	100	10		0.05
Centro senza metionina	220	5.7	His	150	0		0.05
Centro con 100 mM di arginina + 3% di saccarosio	220	5.7	His	100	0	3	0.05
Centro con 20 mM di citrato	220	5.7	Citrato	150	10		0.05

5

**La Figura 3** mostra le tendenze %HMW al variare del pH se conservato a 25 °C + 60% di umidità relativa. Il tasso di aumento di %HMW nel tempo è coerente in questo intervallo di pH.

**La Figura 4** mostra le tendenze %HMW per eccipienti variabili se conservato a 25 °C + 60% di umidità relativa. Il tasso di aumento di %HMW è coerente se l'eccipiente stabilizzante è 150 mM di L-arginina cloridrato + 10 mM di metionina, 100 mM di L-arginina cloridrato + 10 mM di metionina, 150 mM di L-arginina cloridrato senza metionina o 100 mM di L-arginina cloridrato + 3% di saccarosio.

10

**Esempio 4: l'arginina abbassa la viscosità delle formulazioni**

15

La viscosità di ciascuna formulazione è stata misurata a temperatura ambiente (20 °C). La concentrazione proteica ha un impatto significativo sulla viscosità, mentre altre variazioni nella ricetta della formulazione non hanno avuto alcun impatto. Le viscosità < 50cP sono ottimali per i processi di produzione e le opzioni di via di somministrazione. Le formulazioni a base di arginina forniscono una viscosità costantemente bassa (~20cP) ad alta concentrazione

proteica (~220mg/mL) (Figura 5).

**Esempio 5: robustezza della formulazione rispetto alla concentrazione di polisorbato-80**

Le seguenti formulazioni sono state preparate per valutare il livello ottimale di tensioattivo (Polisorabato-80) nella formulazione.

5

**Tabella 9:** formulazioni per lo screening del tensioattivo

Concentrazione proteica (mg/mL)	pH	Tampone	Eccipienti	% Polisorbato-80
160	5,7	20 mM di istidina	150 mM di L-arginina HCl + 10 mM di metionina	0,00%
				0,005%
				0,01%
				0,03%
				0,05%
				0,075%
				0,10%

È stato eseguito uno studio di agitazione per determinare il livello appropriato di tensioattivo necessario per mantenere la stabilità del prodotto durante lo stress fisico. Le formulazioni nella Tabella 9 sono state dispensate in flaconi di vetro da 3 mL e siringhe con puntale in vetro da 1 mL, quindi agitate a 650 giri/min per 72 ore a temperatura ambiente. I controlli non agitati sono stati conservati in fiale di vetro per lo stesso tempo e la stessa temperatura.

10

I risultati della %HMW sono stati coerenti in tutte le formulazioni agitate (Figura 6). I flaconi di controllo non agitati mostrano un aumento graduale di HMW man mano che la % di polisorbato-80 scende dallo 0,05% allo 0,00%. Tutti i risultati rientrano nella variabilità (rumore) del metodo ( $\pm 0,2\%$ ) e potrebbero non essere differenze reali. La stabilità è paragonabile in un'ampia gamma di % di polisorbato-80.

15

**Esempio 6: Il gruppo tiolico contenente eccipienti migliora la stabilità di aggregazione della formulazione di Aducanumab**

L'aggiunta di eccipienti contenenti gruppi tiolici a una formulazione di Aducanumab riduce l'aggregazione determinata dallo sviluppo di specie ad alto peso molecolare durante la conservazione.

La formulazione di controllo di Aducanumab contiene 165 mg/mL di Aducanumab, 20 mM di istidina, 150 mM di L-arginina HCl, 10 mM di metionina, 0,05% di polisorbato-80, pH 5,5. La formulazione di controllo è stata addizionata con gruppo tiolico contenente eccipienti: GSH e GSSG. Le formulazioni sono state conservate a 25 °C al 60% di umidità relativa. Come mostrato in **Figura 7**, l'aggiunta di GSH e GSSG riduce lo sviluppo di specie HMW durante lo stoccaggio.

La stessa formulazione di controllo di Aducanumab è stata arricchita con cisteina e cistina. Queste formulazioni sono state conservate anche a 25 °C al 60% di umidità relativa. Come nel caso di GSH e GSSG, l'aggiunta di cisteina e cistina sopprime lo sviluppo delle specie HMW durante la conservazione (**Figura 8**).

**Esempio 7: la forma ridotta del gruppo tiolico contenente l'eccipiente è efficace quanto la coppia redox nel controllo dell'HMW**

L'aggiunta della forma ridotta di un gruppo tiolico contenente il solo eccipiente ha lo stesso impatto dell'aggiunta della coppia redox.

Una formulazione di controllo di Aducanumab contiene 165 mg/mL di Aducanumab, 20 mM di istidina, 150 mM di L-arginina HCl, 10 mM di metionina, 0,05% di polisorbato-80, pH 5,5. Questa formulazione è stata arricchita con GSH + GSSG, GSH da solo o GSSG da solo. Le formulazioni sono state conservate a 25 °C al 60% di umidità relativa. Come mostrato in **Figura 9**, l'aggiunta di GSH, GSSG e GSH+GSSG ha ridotto la formazione di specie HMW.

**Esempio 8: gli eccipienti contenenti tiolo sono migliori della metionina nel controllo dell'HMW**

L'aggiunta di metionina non aumenta la stabilità osservata con il solo GSH.

Una formulazione di controllo di Aducanumab contiene 165 mg/mL di Aducanumab, 20 mM di istidina, 150 mM di L-arginina HCl, pH 5,5 GSH o GSH + metionina aggiunti alla formulazione di controllo. Queste formulazioni sono state conservate a 25 °C al 60% di umidità relativa. L'aggiunta di metionina non ha fornito alcun beneficio additivo alla riduzione delle specie HMW osservata con il solo GSH (**Figura 10**).

**Esempio 9: robustezza per la formulazione di eccipienti contenenti tiolo a concentrazioni multiple di proteine e GSH**

La riduzione delle specie HMW con l'aggiunta di GSH è stata osservata a concentrazioni multiple di proteine e concentrazioni multiple di GSH.

Aducanumab (165 o 200 mg/mL di Aducanumab, 20 mM di istidina, 150 mM di L-arginina HCl, 10 mM di metionina, 0,05% di polisorbato-80, pH 5,5) è stato conservato a 25 °C al 60% di umidità relativa con vari concentrazioni di GSH. Come mostrato nella **Figura 11**, il GSH sopprime la formazione di specie HMW a concentrazioni da 0,2 mM a 1,0 mM, a concentrazioni proteiche fino a 200 mg/mL.

**Esempio 10: l'eccipiente contenente tiolo è efficace nel controllo dell'HMW a concentrazioni molto basse**

Concentrazioni di un eccipiente contenente tiolo a partire da 0,02 mM hanno migliorato la stabilità di Aducanumab a varie concentrazioni.

Aducanumab (165 o 225 mg/mL di Aducanumab, 20mM di istidina, 150mM di L-arginina HCl, 10mM di metionina, 0,05% di polisorbato-80, pH 5,5) è stato conservato a 25 °C al 60% di umidità relativa con vari concentrazioni di GSH. Come mostrato nella **Figura 12**, il GSH sopprime la formazione di specie HMW a concentrazioni a 0,02 mM, a concentrazioni proteiche fino a 225 mg/mL.

**Esempio 11: effetto dell'aumento dell'eccipiente contenente tiolo su HMW**

Questo esperimento è stato eseguito per valutare l'impatto dell'aumento della

concentrazione di GSH sulla riduzione di HMW.

Tutte le formulazioni testate contenevano 210 mg/mL di aducanumab, 20 mM di istidina, 150 mM di arginina, 10 mM di metionina e 0,05% di polisorbato-SO e differiva solo per la concentrazione di GSH. Le concentrazioni di GSH testate erano 0 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2  
5 mM e 4 mM. I campioni sono stati conservati a 25 °C, 60% di umidità relativa fino a 4,5 mesi.

I dati hanno mostrato che il GSH a 4 mM ha lo stesso impatto sulla riduzione di HMW del GSH da 0,5 mM a 2 mM (si vedala **Figura 13**).

#### **Esempio 12: effetto dell'aumento delle concentrazioni di metionina su HMW**

Questo esperimento è stato eseguito per valutare l'impatto dell'aumento della  
10 concentrazione di metionina sulla riduzione di HMW.

Tutte le formulazioni testate contenevano 165 mg/mL di aducanumab, 20 mM di istidina, 150 mM di arginina e 0,05% di polisorbato-80, e differivano solo per la concentrazione di metionina o GSH come mostrato nella **Figura 14**. I campioni sono stati conservati a 25 °C, 60% di umidità relativa (in alto) e 40 °C, 75% di umidità relativa (in basso) fino a 3,5 mesi.

15 Questo esperimento ha dimostrato che l'aumento della concentrazione di metionina a 150 mM ha contribuito a ridurre l'HMW rispetto a 10 mM di metionina.

#### **Esempio 13: uno studio di tollerabilità e tossicocinetica di 4 settimane di BIIB037 somministrato mediante iniezione endovenosa e sottocutanea a scimmie Cynomolgus**

L'obiettivo di questo studio era determinare la tollerabilità di BIIB037 [forza 150  
20 mg/mL in tampone di istidina 20 mM (16,2 mM L-istidina monoidrato, 3,8 mM L-istidina base libera), 150 mM L-arginina cloridrato (HCl), 10 mM di metionina e 0,05% di polisorbato 80 pH 5,5] quando somministrato per iniezione endovenosa (EV) o sottocutanea (SC) una volta alla settimana per 4 settimane a 3 scimmie cynomolgus per gruppo. Inoltre, sono state determinate le caratteristiche tossicocinetiche dell'articolo in esame.

25 Somministrazione sia endovenosa sia sottocutanea di BIIB037 a 300 mg/kg/dose una

volta alla settimana per 4 settimane [area sotto la curva concentrazione-tempo del Giorno 22 dal tempo 0 al tempo t (AUC<sub>0-t</sub>): 324.000 µg•h/mL e 243.000 µg•h/mL per EV e SC, rispettivamente) non ha prodotto osservazioni cliniche o effetti avversi sul peso corporeo o sul consumo di cibo. Le osservazioni nel sito di iniezione SC erano limitate a un animale iniettato

5 SC dopo le somministrazioni della terza e quarta settimana che consisteva in eritema e/o edema non avverso, molto lieve, accompagnato da probabile lieve infiltrazione cellulare neutrofila e mononucleare correlata alla procedura ed emorragia (associato solo al quarto sito di iniezione). La % di biodisponibilità assoluta variava dal 56,7% al 75,1% per AUC<sub>τ</sub> su SD 1 e SD 22, indicando una buona cinetica di assorbimento dopo la somministrazione SC di aducanumab. Il

10 riepilogo dei parametri TK medi è presentato in **Tabella 10**.

**Tabella 10: riepilogo dei parametri tossicocinetici medi nello studio sulle scimmie**

**Cynomolgus maschio di 4 settimane EV e SC**

<b>Dose</b>	<b>300 mg/kg EV</b>	<b>300 mg/kg SC</b>
<b>Numero di animali</b>	<b>M (3)</b>	<b>M (3)</b>
<b>Giorno 1</b>		
<b>C<sub>max</sub> (µg/mL)</b>	6.930	1.180
<b>AUC<sub>τ</sub> (µg•h/mL)</b>	236.000	134.000
<b>T<sub>max</sub> (h)</b>	0,083	12 o 24
<b>Giorno 22</b>		
<b>C<sub>max</sub> (µg/mL)</b>	7.070	2.490
<b>AUC<sub>τ</sub> (µg•h/mL)</b>	324.000	243.000
<b>T<sub>max</sub> (h)</b>	da 0,083 a 2	da 12-a 24
AUC <sub>τ</sub> = AUC <sub>0-t</sub> (parametro TK utilizzato nella relazione dello studio P037-16-01) = area sotto la curva concentrazione-tempo dal momento 0 all'ultima concentrazione; C <sub>max</sub> = massima concentrazione osservata, che si verifica a T <sub>max</sub> ; SD = Giornata di studio; T <sub>max</sub> = tempo di massima concentrazione osservata		

**Pagina 1 di 6**  
**Elenco delle sequenze**

<110> BIOGEN MA INC.

<120> **COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE CONTENENTI ANTICORPI ANTI-BETA  
AMILOIDE**

<130> 13751-0265W01

<140> PCT/US2018/047508

<141> **22/08/2018**

<150> 62/548,583

<151> **22/08/2017**

<160> 12

<170> PatentIn versione 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Tyr Gly Met His  
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp Val  
1 5 10 15

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn  
1 5 10

Pagina 2 di 6

<210> 5  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 5  
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
1 5  
  
<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 6  
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr  
1 5  
  
<210> 7  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 7  
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15  
  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30  
  
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
  
Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val  
50 55 60  
  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
  
Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
  
Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp  
100 105 110  
  
Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120  
  
<210> 8  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

Pagina 3 di 6

<400> 8  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15  
  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30  
  
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45  
  
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80  
  
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu  
85 90 95  
  
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105  
  
<210> 9  
<211> 453  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 9  
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15  
  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30  
  
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
  
Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val  
50 55 60  
  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
  
Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
  
Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp  
100 105 110

Pagina 4 di 6

Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
130 135 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro  
210 215 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
355 360 365

Pagina 5 di 6

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly  
450

<210> 10  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 10  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Pagina 6 di 6

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 11  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 11  
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val  
35 40

<210> 12  
<211> 42  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 12  
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala  
35 40

## RIVENDICAZIONI

1. Composizione farmaceutica comprendente  
un anticorpo anti-beta amiloide (A $\beta$ ) a una concentrazione da 75 mg/mL a 225 mg/mL;  
cloridrato di arginina (Arg.HCl) a una concentrazione di 150 mM;  
metionina a una concentrazione di 10 mM;  
istidina a una concentrazione di 20 mM; e  
Polisorbato-80 (PS80) a una concentrazione dallo 0,01% allo 0,1%,  
in cui la composizione farmaceutica ha un pH da 5,2 a 6,2;  
in cui l'anticorpo anti-A $\beta$  comprende una catena pesante dell'immunoglobulina e una catena leggera dell'immunoglobulina, in cui la catena pesante comprende la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO:9 e la catena leggera comprende la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 10.
2. La composizione farmaceutica della rivendicazione 1, in cui la composizione farmaceutica comprende l'anticorpo anti-A $\beta$  a una concentrazione di:
  - (i) 175 mg/mL;
  - (ii) 150 mg/mL; o
  - (iii) 100 mg/mL.
3. La composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui la composizione farmaceutica comprende PS80 a una concentrazione dallo 0,03% allo 0,08%.
4. La composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 3, in cui la composizione farmaceutica comprende PS80 a una concentrazione dello 0,05%.
5. La composizione farmaceutica di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui la composizione farmaceutica ha un pH da 5,3 a 5,7.
6. La composizione farmaceutica della rivendicazione 5, in cui la composizione farmaceutica ha un pH di 5,5.

7. La composizione farmaceutica della rivendicazione 1, in cui la composizione comprende l'anticorpo anti-A $\beta$  alla concentrazione di 150 mg/mL; e PS80 alla concentrazione dello 0,05%.
8. La composizione farmaceutica della rivendicazione 1, in cui la composizione comprende l'anticorpo anti-A $\beta$  alla concentrazione di 100 mg/ml; e PS80 alla concentrazione dello 0,05%.
9. La composizione farmaceutica della rivendicazione 7 o 8, in cui la composizione farmaceutica ha un pH di 5,5.
10. La composizione farmaceutica di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9 per l'uso nel trattamento del morbo di Alzheimer in un soggetto umano che ne ha bisogno.
11. La composizione farmaceutica per l'uso della rivendicazione 10, in cui la composizione farmaceutica deve essere somministrata per via sottocutanea al soggetto umano.
12. La composizione farmaceutica per l'uso della rivendicazione 10, in cui la composizione farmaceutica deve essere somministrata per via endovenosa al soggetto umano.

\* \* \* \*

Seguono n° 14 tavole di disegno.

Si dichiara che la presente traduzione è conforme al testo originale in lingua inglese.

Brescia, 20 aprile 2023

In Fede,

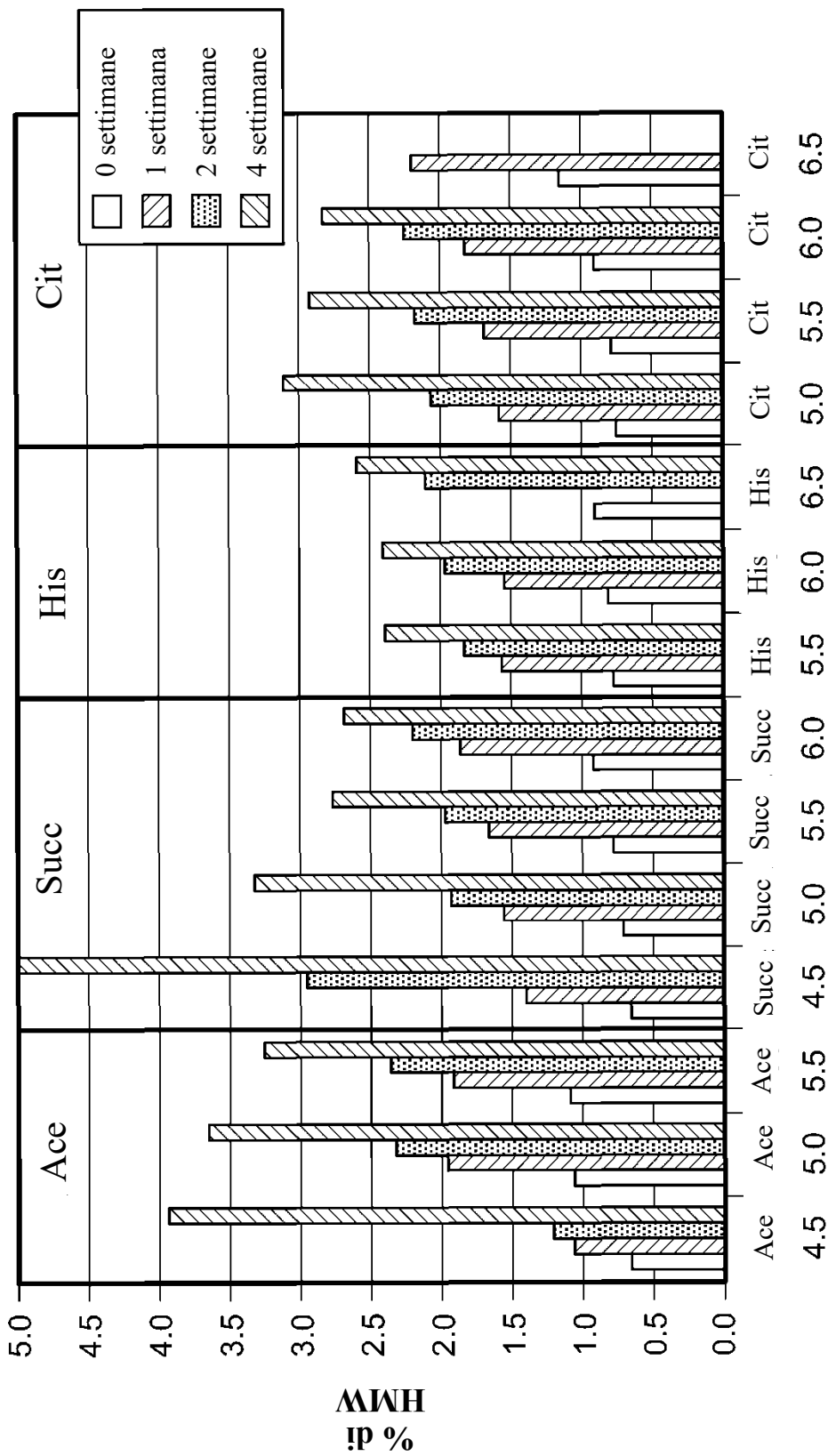


FIGURA 1

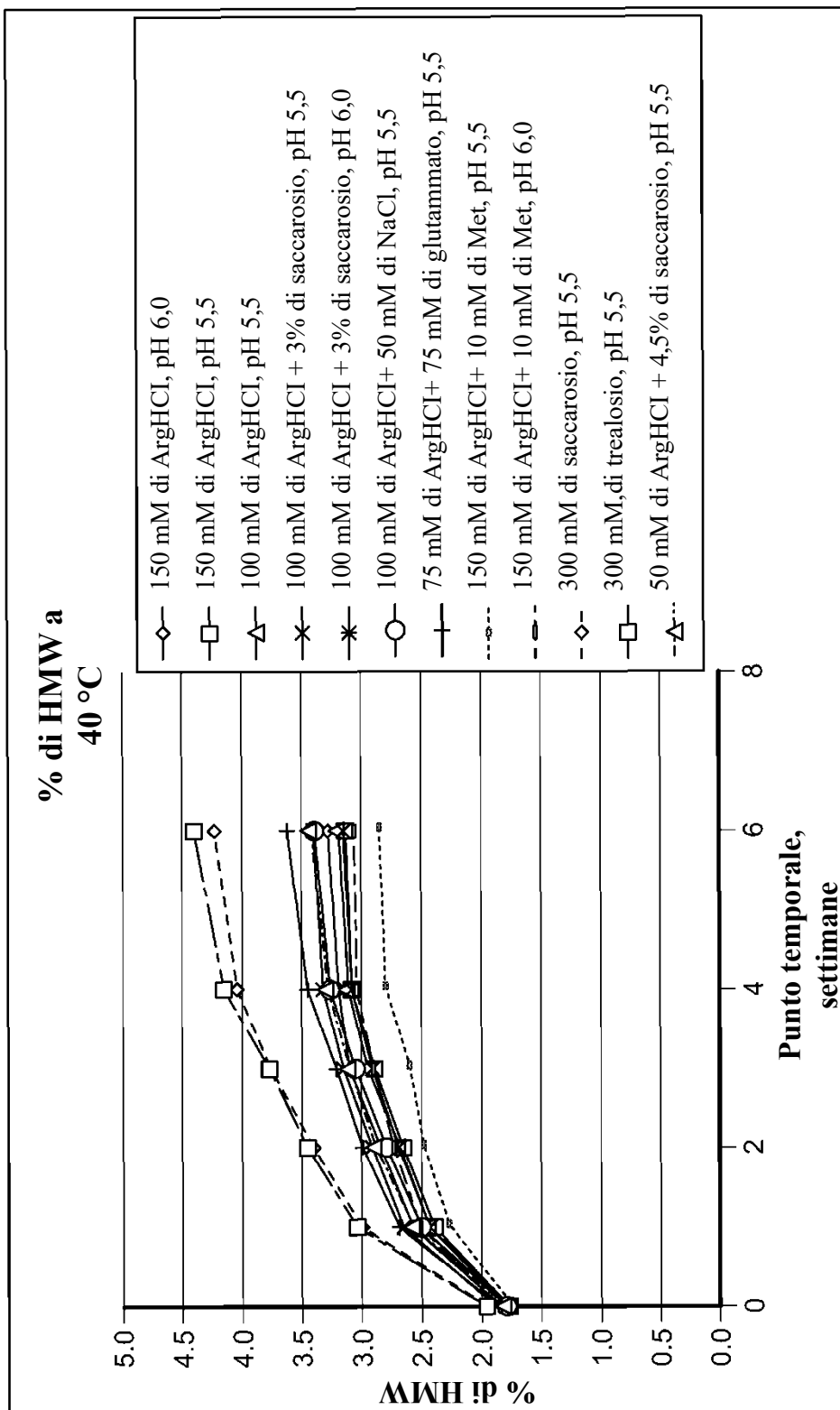
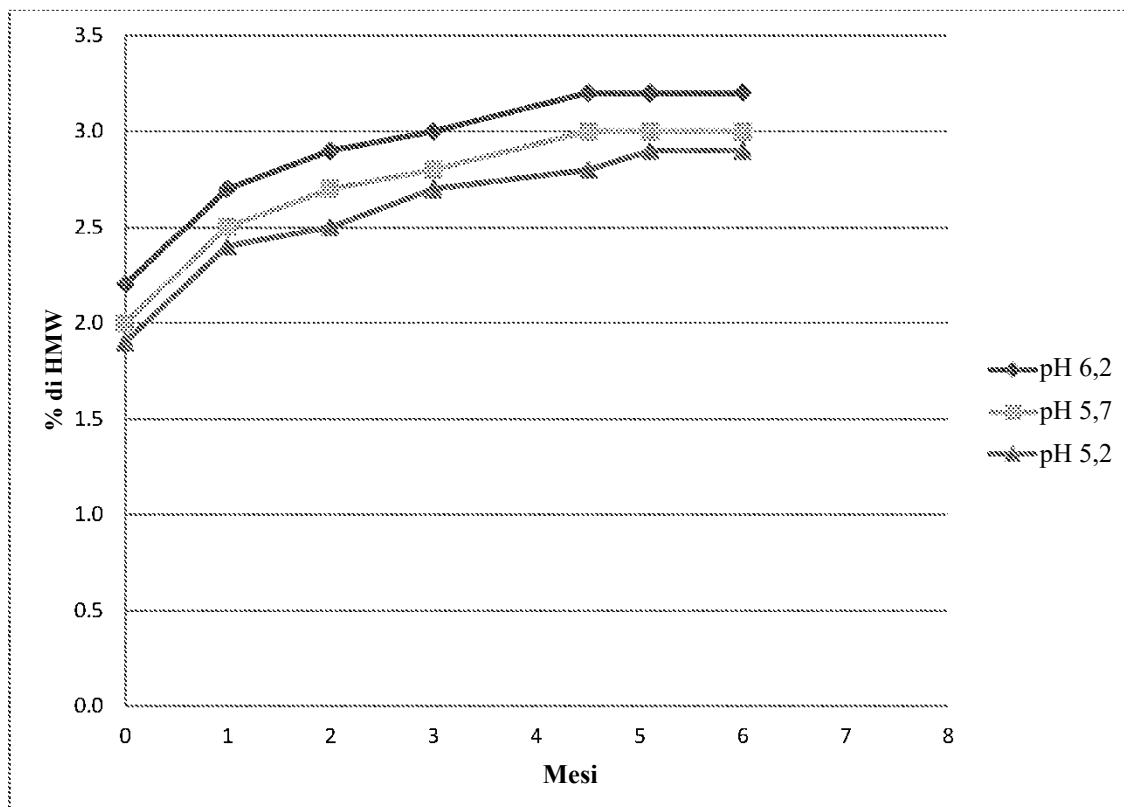


FIGURA 2

FIGURA 3



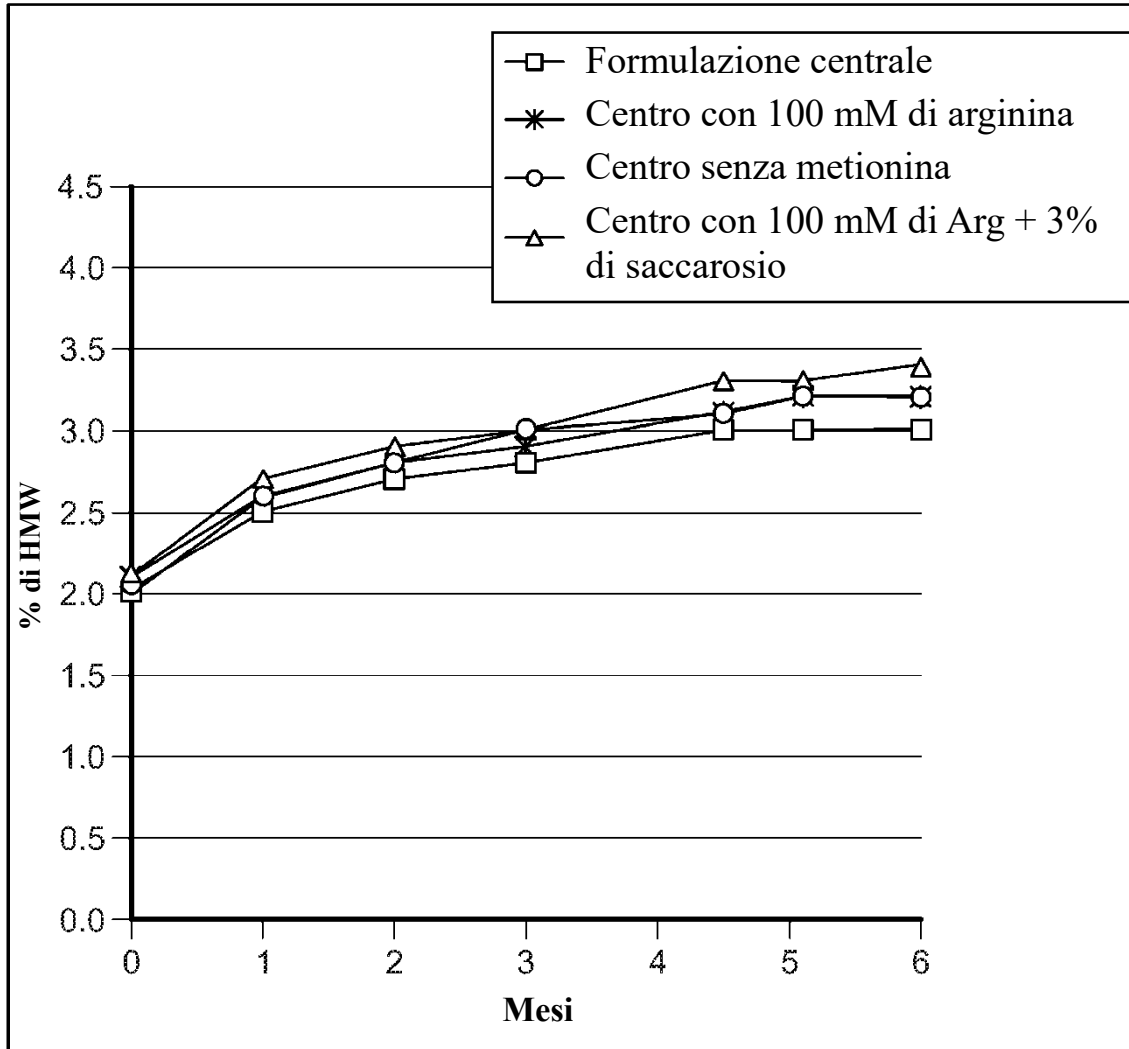
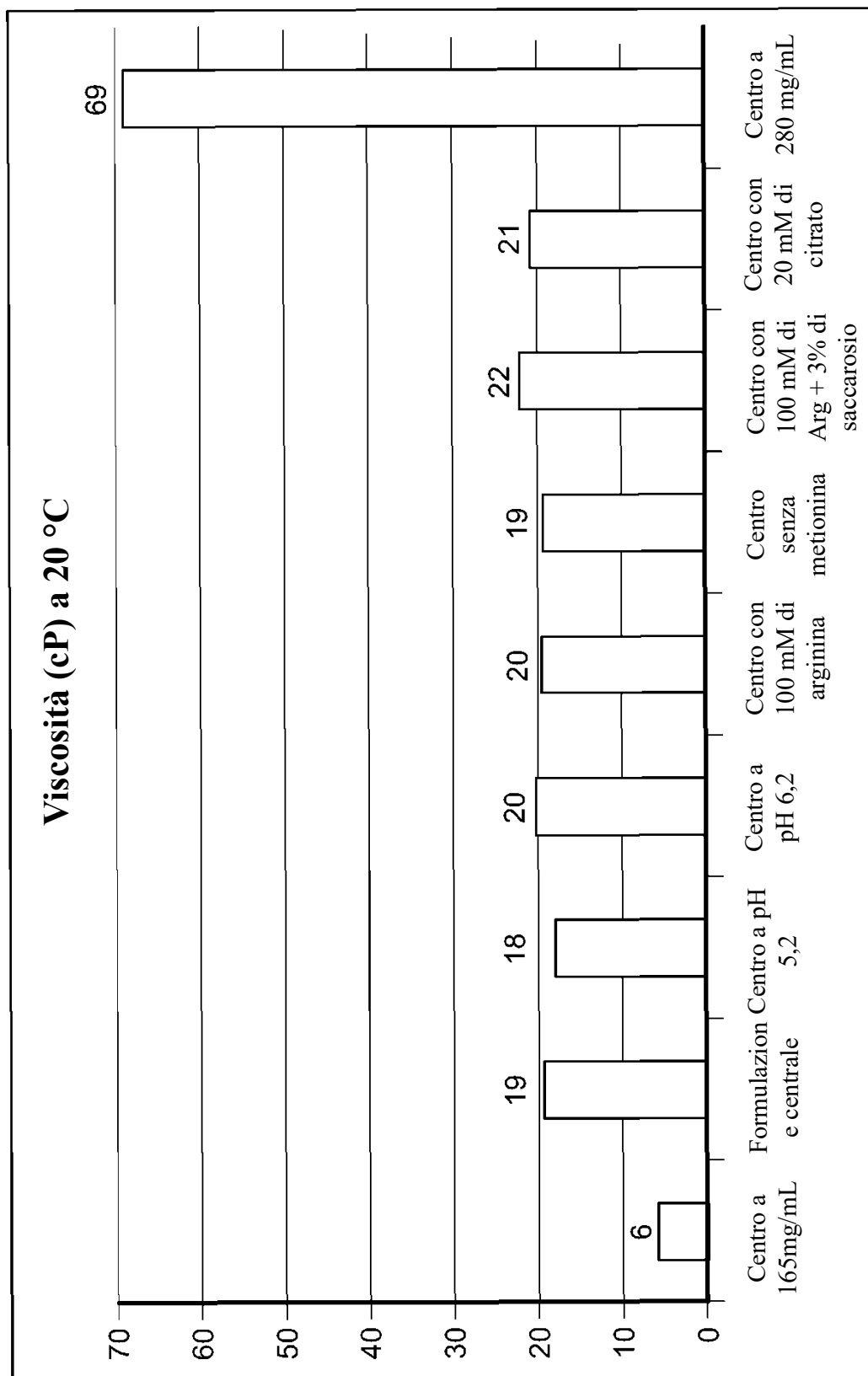


FIGURA 4



**FIGURA 5**

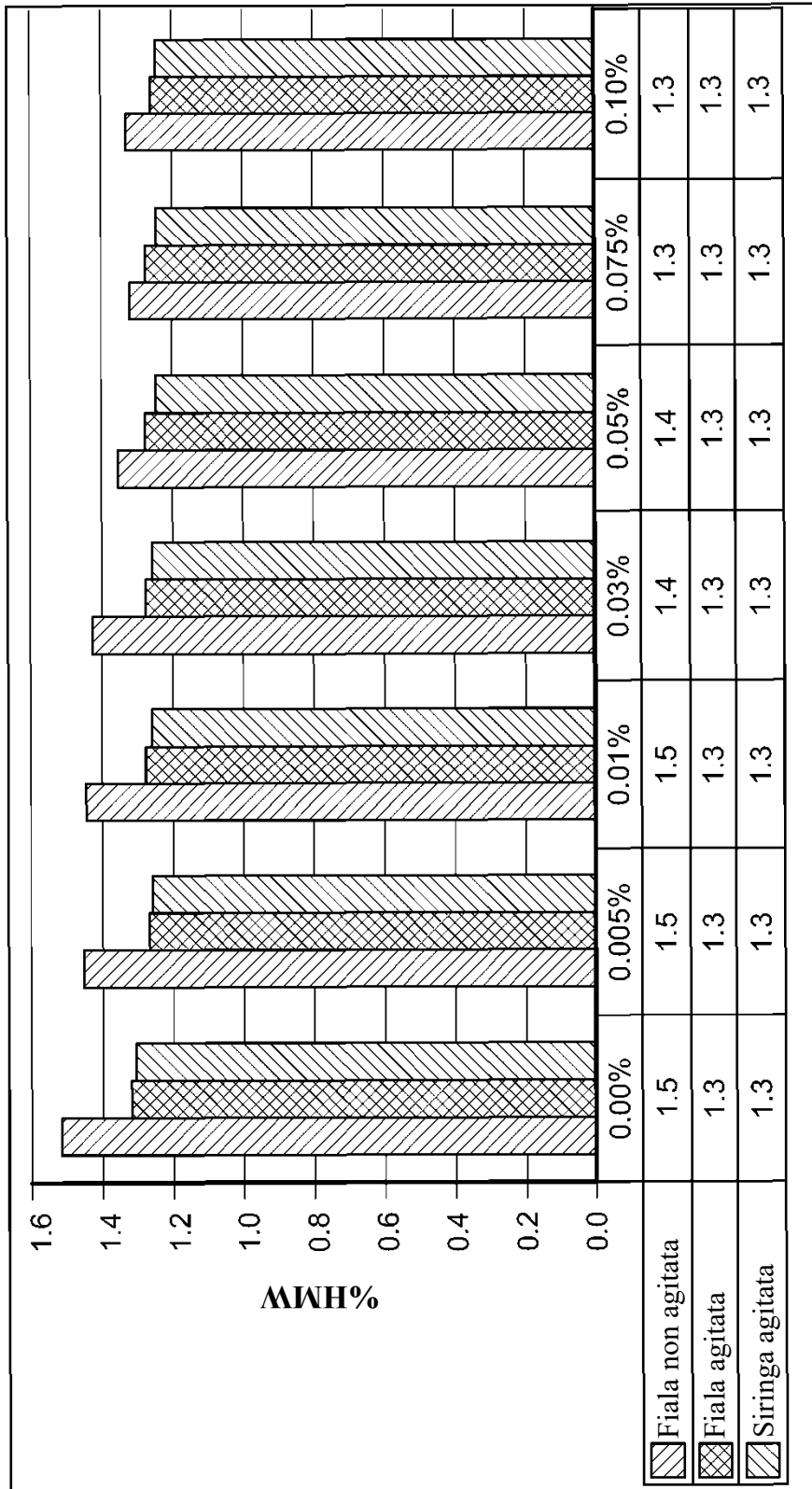
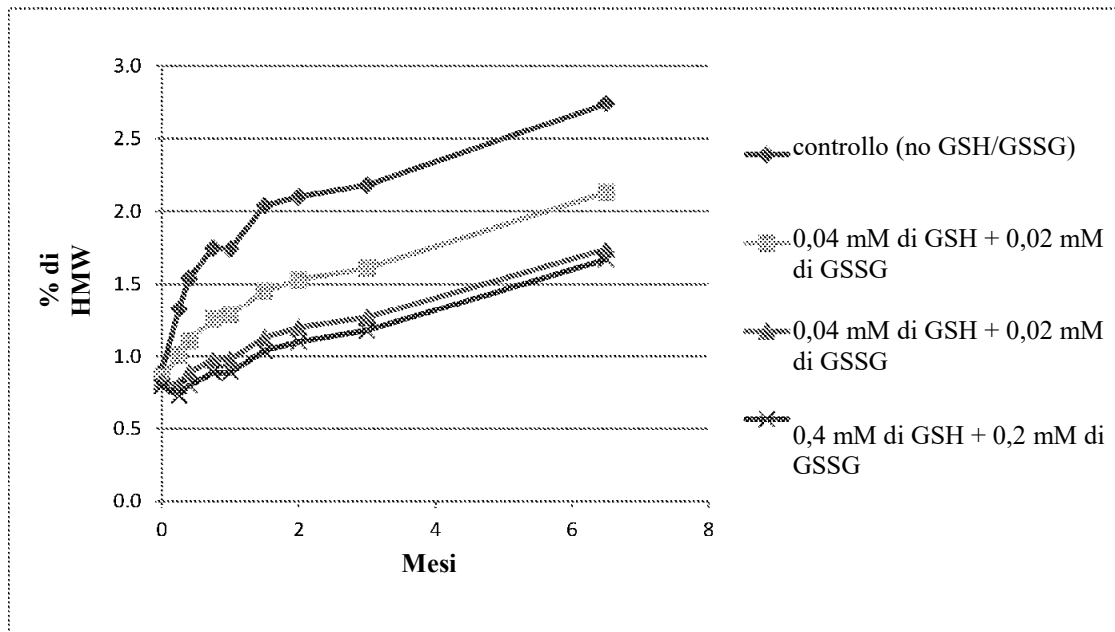


FIGURA 6

FIGURA 7



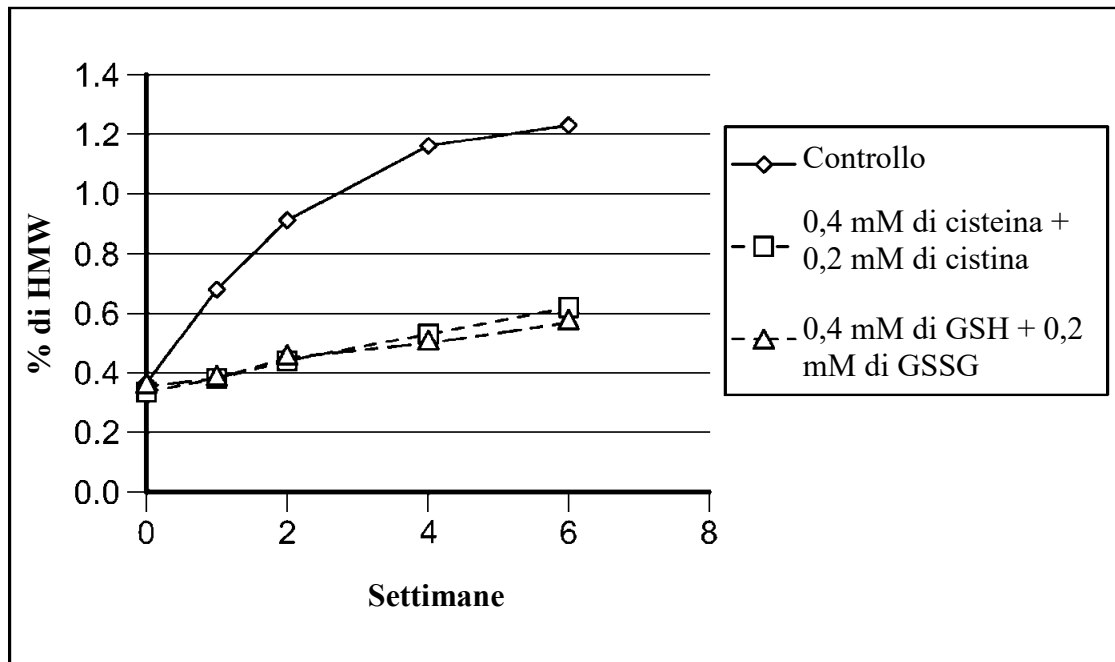


FIGURA 8

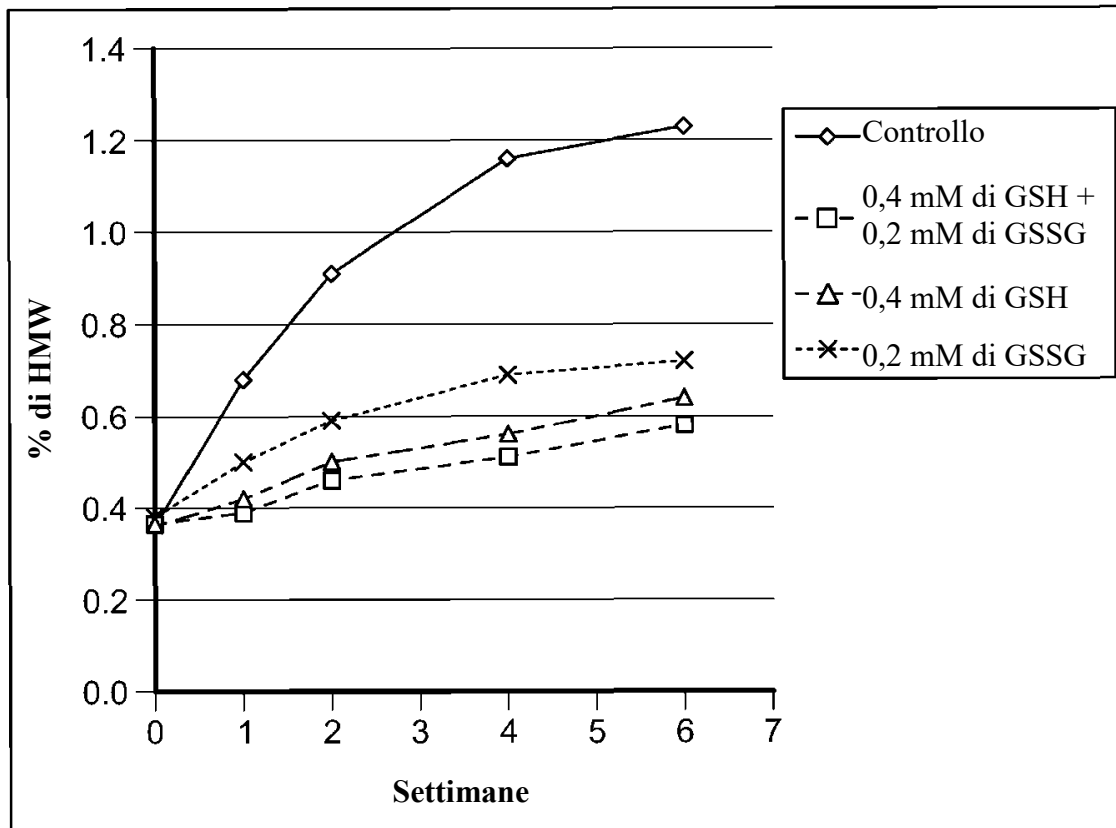


FIGURA 9

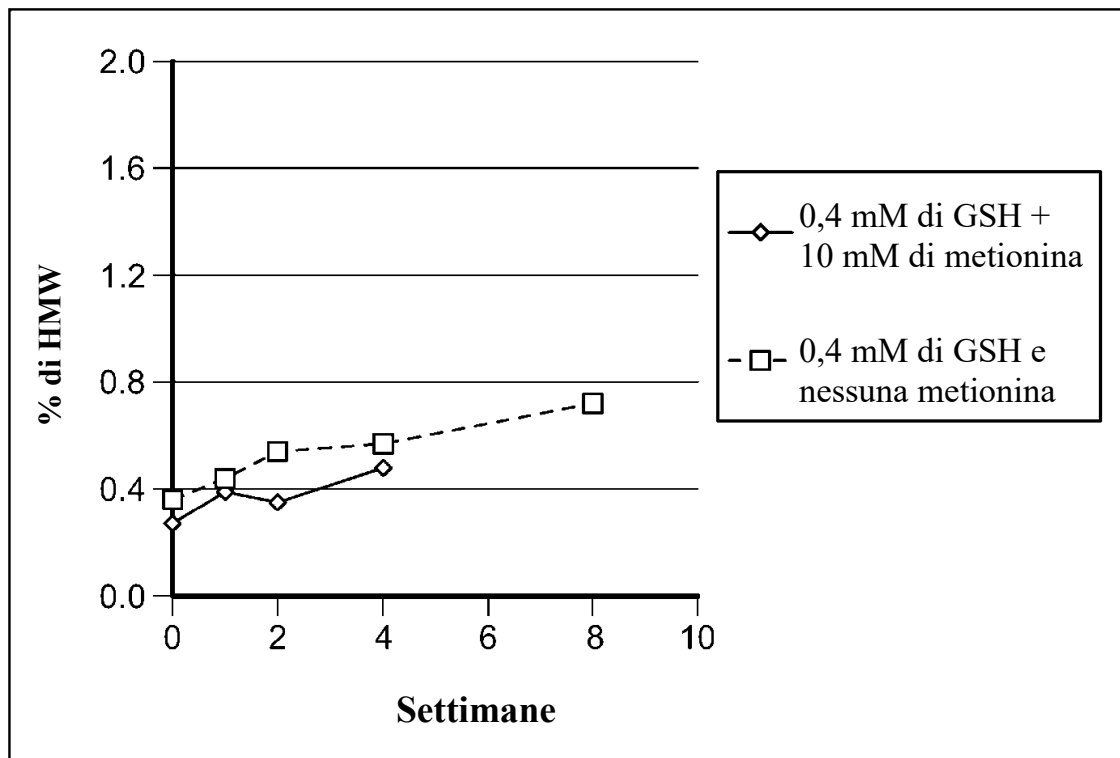


FIGURA 10

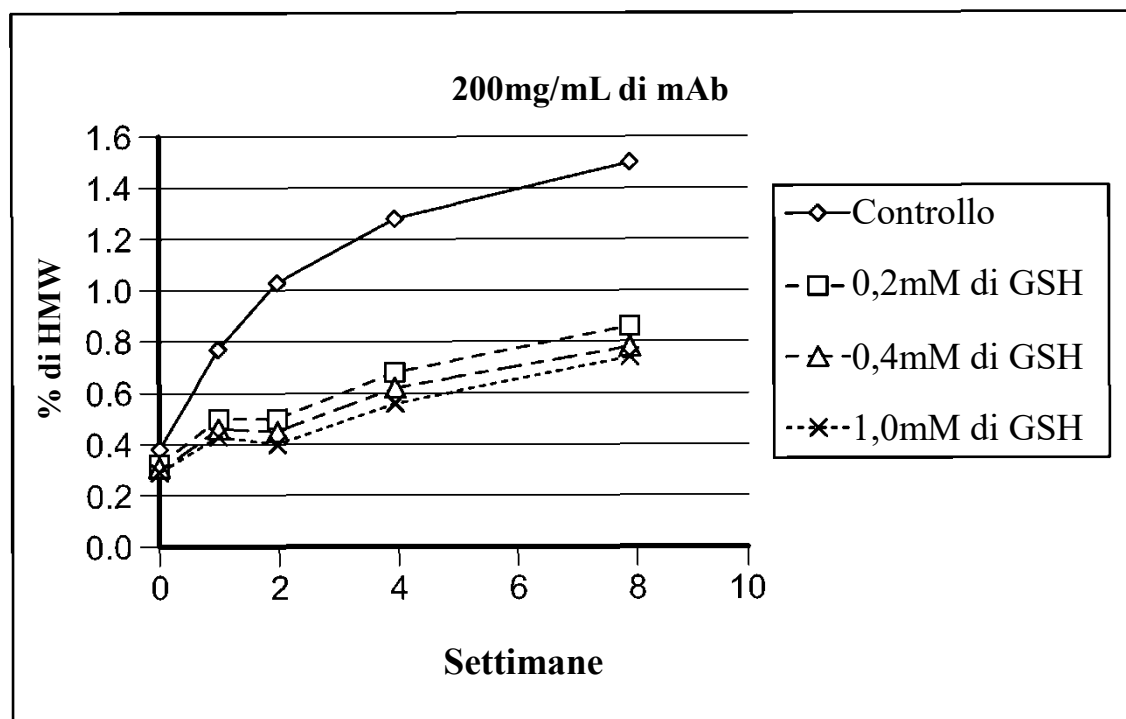
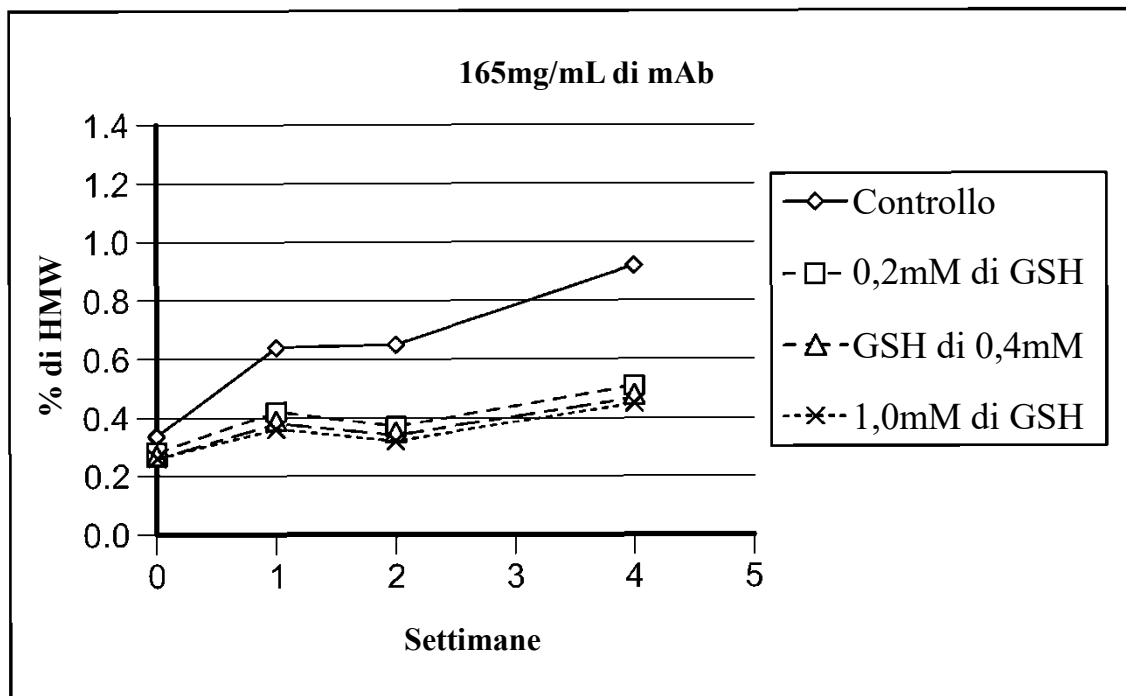


FIGURA 11

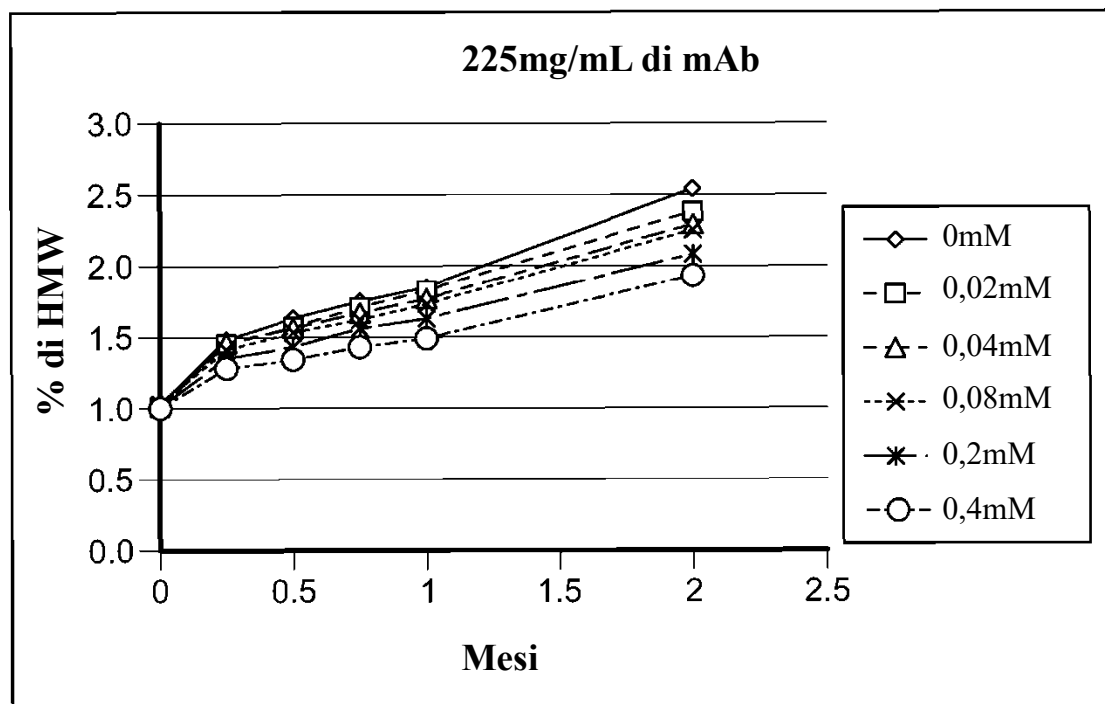
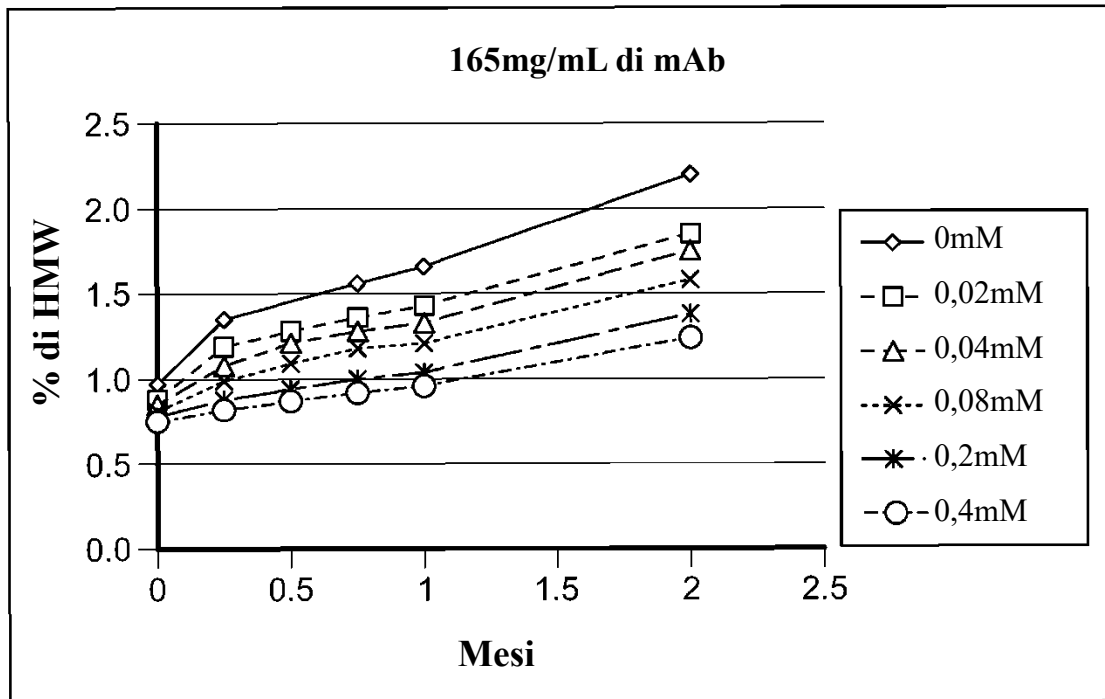


FIGURA 12

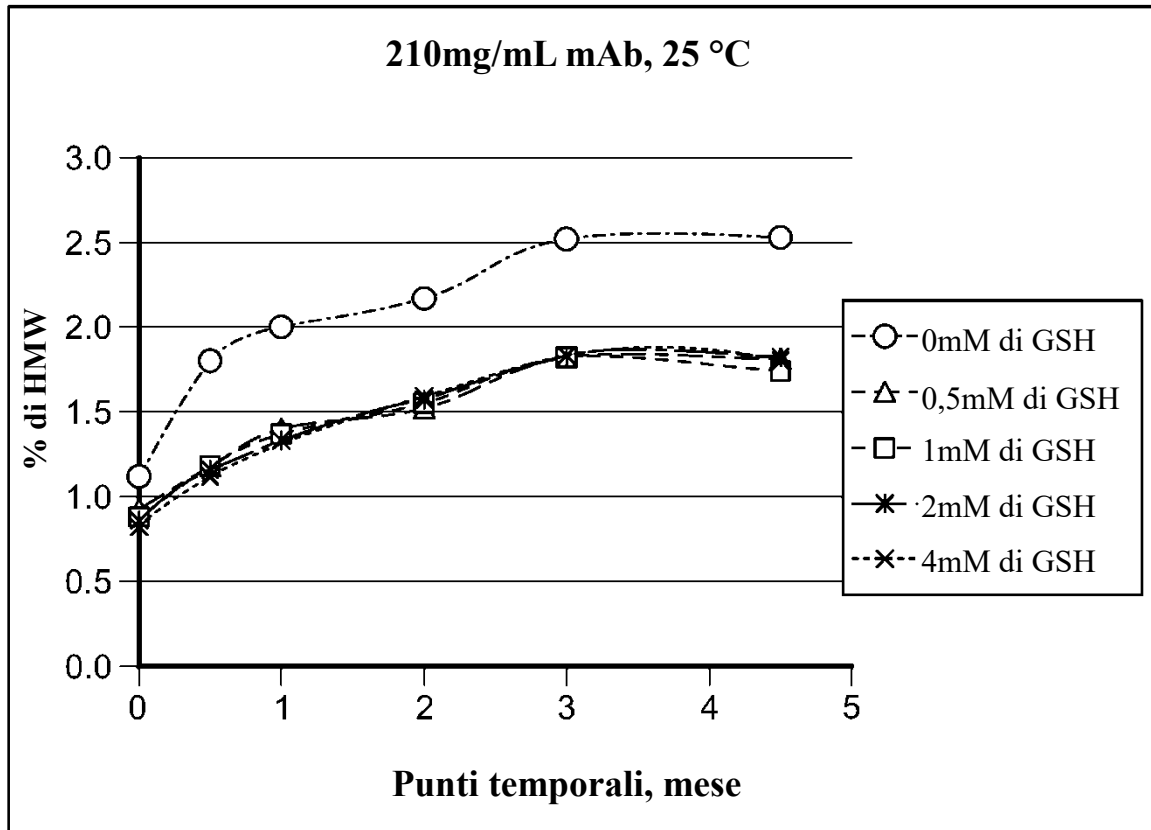


FIGURA 13

FIGURA 14

