

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 205**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 47/18 (2007.01)

A61K 47/26 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2012** **PCT/US2012/031063**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012** **WO12135408**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2012** **E 12763896 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018** **EP 2691112**

54 Título: **Formulaciones estables de anticuerpos para el receptor PD-1 humano de muerte programada y tratamientos relacionados**

30 Prioridad:

31.03.2011 US 201161470121 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.07.2018

73 Titular/es:

MERCK SHARP & DOHME CORP. (100.0%)
126 East Lincoln Avenue
07065-0907 Rahway , New Jersey , US

72 Inventor/es:

SHARMA, MANOJ K.;
NARASIMHAN, CHAKRAVARTHY NACHU;
GERGICH, KEVIN JAMES y
KANG, SOONMO PETER

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 676 205 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulaciones estables de anticuerpos para el receptor PD-1 humano de muerte programada y tratamientos relacionados

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de EE.UU. N.º 61/470.121, enviada el 31 de marzo de 2011.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a formulaciones estables de anticuerpos contra el receptor PD-1 de muerte programada. La presente invención proporciona además formulaciones estables de anticuerpos contra PD-1 humano para su uso en métodos para el tratamiento de diversos cánceres e infecciones crónicas.

Antecedentes de la invención

Muerte Programada 1 (PD-1), un miembro de la familia génica coestimulante CD28, se expresa moderadamente en células T, B y NKT vírgenes y se regula positivamente por el receptor de células T/B en linfocitos, monocitos y células mieloides (1). PD-1 tiene dos ligandos conocidos con distintos perfiles de expresión, PD-L1 (B7-H1) y PD-L2 (B7-DC). La expresión de PD-L2 está relativamente restringida y se encuentra en células dendríticas activadas, macrófagos y monocitos y en células endoteliales vasculares (1-3). Por el contrario, PD-L1 se expresa más ampliamente incluyendo en linfocitos vírgenes y su expresión se induce en células B y T activadas, monocitos y células dendríticas. Adicionalmente, por el ARNm, se expresa por tejidos no linfoides incluyendo células endoteliales vasculares, células epiteliales y células musculares.

PD-1 se reconoce como un jugador importante en la regulación inmune y el mantenimiento de la tolerancia periférica. En el ratón, se mostró que esto requiere la expresión de PD-L1 en tejidos periféricos y la ligación de PD-1 en células T potencialmente autorreactivas para modular negativamente la activación de células T que implican una secuencia ITIM en el dominio citoplasmático PD-1 (1, 4).

Dependiendo del fondo genético específico, los ratones *pdc1^{-/-}* desarrollan espontáneamente fenómenos tipo lupus o cardiomiopatía dilatada (5, 6). Adicionalmente, el bloqueo inducido por anticuerpos de la ruta PD-1 / PD-L1 se demostró que acelera la aparición de insulinitis autoinmune y diabetes en ratones NOD (7).

Se descubrió que los cánceres humanos que surgen en diversos tejidos sobre-expresan PD-L1 o PD-L2. En conjuntos grandes de muestras de cánceres por ejemplo de ovario, renal, colorrectal, pancreático, de hígado y melanoma se mostró que la expresión de PD-L1 se correlacionó con una prognosis pobre y una supervivencia global reducida independientemente del tratamiento posterior (15-26). De forma similar, se descubrió que la expresión de PD-1 en los linfocitos de infiltración de tumores marca células T disfuncionales en cáncer de mama y melanoma (27-28) y se correlaciona con prognosis pobre en el cáncer renal (29). Usando muestras de pacientes primarios, se demostró que el bloqueo de PD-1 o PD-L1 *in vitro* dio como resultado la potenciación de la activación de células T específicas de tumor y la producción de citocinas (30). En consecuencia, en varios modelos de tumor singénico murino, el bloqueo de PD-1 o bien PD-L1 inhibió significativamente el crecimiento tumoral o indujo la regresión completa.

Se descubrió un mA b bloqueante de PD-1 (h409A11) y se desarrolló para su uso en el tratamiento de pacientes de cáncer humano y pacientes infectados con virus crónicos (descritos en la solicitud co-pendiente WO2008/156712).

La disfunción o tolerancia de células T específicas de antígeno se ejemplifica por la pérdida acumulada del potencial para producir Interleucina 2 (IL-2), Factor de Necrosis Tumoral (TNF) α , perforina, interferón (IFN) γ (8) y la incapacidad de montar una respuesta proliferativa al desencadenante de receptores de células T (1). La ruta PD-1 controla la tolerancia a células T específica de antígeno y se encontró explotarse en la infección vírica y el desarrollo de tumores para controlar y evadir la inmunidad eficaz de células T.

En la infección crónica con LCMV (ratón), VIH, VHB o VHC (humano), se descubrió que las células T específicas de antígeno expresan niveles aberrantemente altos de PD-1 que se correlacionan con su estado de anergia o disfunción (9). Se demostró que bloquear la interacción PD-1 – PD-L1 *in vivo* (LCMV) o *in vitro* (VIH, VHC, VHB) revive la actividad de células T anti-víricas (10-12). El bloqueo de PD-1 en macacos recientemente infectados con el Virus de la Inmunodeficiencia Simia dio como resultado una fuerte reducción de la carga vírica y la supervivencia aumentada (13). De forma similar, la reducción en la carga vírica se confirmó en un segundo estudio usando macacos Rhesus infectados con VIS a largo plazo (14).

Globalmente, la ruta PD-1/PD-L1 es una diana bien validada para el desarrollo de anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de cáncer. Los anticuerpos anti-PD-1 también son útiles para el tratamiento de infección vírica crónica. Las células T CD8⁺ de memoria generadas después de una infección vírica aguda son altamente funcionales y constituyen un componente importante de inmunidad protectora. Por el contrario, las infecciones crónicas se

caracterizan normalmente por grados variables de deterioro funcional (agotamiento) de las respuestas de células T específicas de virus y este defecto es una razón principal para la incapacidad del hospedador de eliminar el patógeno persistente. Aunque las células T efectoras funcionales se generan inicialmente durante las fases tempranas de infección, gradualmente pierden la función durante el transcurso de una infección crónica. Barber *et al.* (Barber *et al.*, Nature 439: 682-687 (2006)) mostró que los ratones infectados con una cepa de laboratorio de LCMV desarrollaron infección crónica dando como resultado altos niveles de virus en la sangre y otros tejidos. Estos ratones desarrollaron inicialmente una respuesta de células T robustas, pero finalmente sucumbieron a la infección tras el agotamiento de las células T. Los autores descubrieron que la disminución en el número y la función de las células T efectoras en ratones crónicamente infectados podría revertirse inyectando un anticuerpo que bloquee la interacción entre PD-1 y PD-L1.

También se ha demostrado que PD-1 se expresa altamente en células T de individuos infectados con VIH y que la expresión del receptor se correlaciona con la función deteriorada de células T y el avance de la enfermedad (Day et al., Day et al., Nature 443:350-4 (2006); Trautmann L. *et al.*, Nat. Med. 12: 1198-202 (2006)). En ambos estudios, el bloqueo de la ruta PD-1 usando anticuerpos contra el ligando PD-L1 aumentó significativamente la expansión de las células productoras de IFN-gamma específicas de VIH *in vitro*.

Otros estudios también implican la importancia de la ruta PD-1 en el control de la infección vírica. Los ratones PD-1 desactivados para PD-1 exhibieron mejor control de la infección de adenovirus que los ratones de tipo silvestre (Iwai et al., Exp. Med. 198:39-50 (2003)). Además, la transferencia adoptiva de las células T específicas de VHB en animales transgénicos VHB iniciaron hepatitis (Isogawa M. et al., Immunity 23:53-63 (2005)). El estado de la enfermedad de estos animales oscila como una consecuencia del reconocimiento de antígenos en el hígado y la regulación positiva de PD-1 por las células hepáticas.

Los anticuerpos terapéuticos pueden usarse para bloquear la actividad de citocinas. Una limitación significativa en el uso de anticuerpos como un agente terapéutico *in vivo* es la inmunogenicidad de los anticuerpos. Como la mayoría de anticuerpos monoclonales deriva de especies no humanas, su uso repetido en humanos da lugar a la generación de una respuesta inmune contra el anticuerpo terapéutico. Dicha respuesta inmune resulta en una pérdida de efectividad terapéutica en un mínimo y potencialmente una respuesta anafiláctica fatal. En consecuencia, los anticuerpos de inmunogenicidad reducida en humanos, tales como anticuerpos humanizados o completamente humanos, se prefieren para el tratamiento de sujetos humanos. Los anticuerpos terapéuticos a modo de ejemplo específicos para PD-1 humano se desvelan en la Solicitud de Patente de EE.UU. comúnmente asignada con N.º de Publicación US2010/0266617 y en la Publicación de Patente Internacional N.º WO2008/156712.

Los anticuerpos para su uso en sujetos humanos deben almacenarse antes de su uso y transportarse al punto de administración. Conseguir la reproducibilidad de un nivel deseado de anticuerpo en un sujeto requiere que el fármaco se almacene en una formulación que mantenga la bioactividad del fármaco. Existe la necesidad de formulaciones estables de anticuerpos anti-PD-1 humano para su uso farmacéutico, por ejemplo, para tratar diversos cánceres y enfermedades infecciosas. Preferentemente, dichas formulaciones exhibirán una vida útil larga, pero serán estables cuando se almacenen y transporten y serán susceptibles de administración a altas concentraciones, por ejemplo para su uso en administración subcutánea, así como a bajas concentraciones, por ejemplo para administración intravenosa.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a formulaciones estables de anticuerpos contra el receptor de muerte programada PD-1 humano. La presente invención proporciona además formulaciones estables de anticuerpos contra el receptor de muerte programada PD-1 humano para su uso en métodos para el tratamiento de diversos cánceres e infecciones crónicas.

En ciertas realizaciones, la invención se refiere a una formulación liofilizada de un anticuerpo anti-PD-1 humano, que comprende: a) dicho anticuerpo anti-PD-1 humano; b) tampón histidina; c) polisorbato 80; y d) sacarosa.

En ciertas realizaciones, la formulación tiene un pH entre 5,0 y 6,0 cuando se reconstituye.

En ciertas realizaciones, la formulación liofilizada estable permite la reconstitución del anticuerpo, a una concentración de entre 25 mg/ml y 100 mg/ml.

En ciertas realizaciones, el polisorbato 80 está presente en una relación en peso de aproximadamente el 0,02 % (p/v).

En ciertas realizaciones, la sacarosa está presente en una relación en peso de aproximadamente el 7 % (p/v).

En realizaciones aún adicionales, la invención se refiere a una formulación farmacéutica liofilizada estable de un anticuerpo anti-PD-1 humano, producido liofilizando una solución acuosa que comprende: a) 25-100 mg/ml de anticuerpo; b) 70 mg/ml de sacarosa; c) 0,2 mg/ml de polisorbato 80; y d) tampón histidina 10 mM a pH 5,0-6,0.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 humano está presente a 25 mg/ml en la solución acuosa. En ciertas realizaciones, la solución acuosa tiene un pH de 5,5.

- 5 En realizaciones aún adicionales, la invención se refiere a una formulación farmacéutica liofilizada estable de un anticuerpo anti-PD-1 humano, que cuando se reconstituye comprende: a) 25-100 mg/ml de anticuerpo; b) 70 mg/ml de sacarosa; c) 0,2 mg/ml de polisorbato 80; y d) tampón histidina 10 mM a pH 5,0-6,0.

- 10 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 humano está presente a 25 mg/ml en la solución reconstituida. En ciertas realizaciones, la solución reconstituida tiene un pH de 5,5.

En realizaciones aún adicionales, la invención se refiere a una formulación farmacéutica líquida estable de un anticuerpo anti-PD-1 humano: a) 25-100 mg/ml de anticuerpo; b) 70 mg/ml de sacarosa; c) 0,2 mg/ml de polisorbato 80; y d) tampón histidina 10 mM a pH 5,0-6,0.

- 15 En realizaciones aún adicionales, la invención se refiere a una formulación farmacéutica estable de un anticuerpo anti-PD-1 humano que comprende: a) dicho anticuerpo anti-PD-1 humano; b) tampón histidina; c) polisorbato 80; y d) sacarosa. En ciertas realizaciones, la formulación tiene un pH entre 5,0 y 6,0 cuando se reconstituye. En ciertas realizaciones, el polisorbato 80 está presente en una relación en peso de aproximadamente el 0,02 % (p/v). En ciertas realizaciones, la sacarosa está presente a una relación en peso de aproximadamente el 7 % (p/v).

- 25 En realizaciones aún adicionales, la divulgación se refiere a cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento, en las que el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una cadena ligera que comprende tres secuencias CDR seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, 10, 11, 15, 16 y 17.

En realizaciones aún adicionales, la divulgación se refiere a cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento, en las que el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una cadena pesada que comprende tres secuencias CDR seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, 13, 14, 18, 19 y 20.

- 30 En realizaciones aún adicionales, la divulgación se refiere a cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento, en las que el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende: i) una cadena ligera que comprende tres secuencias CDR de SEQ ID NO: 15, 16 y 17; y ii) una cadena pesada que comprende tres secuencias CDR de SEQ ID NO: 18, 19 y 20.

- 35 En realizaciones aún adicionales, la divulgación se refiere a cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento, en las que el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 20 a 130 de SEQ ID NO: 32.

- 40 En realizaciones aún adicionales, la divulgación se refiere a cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento, en las que el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 31.

- 45 La invención se refiere a formulaciones descritas en el presente documento, en las que el anticuerpo comprende: i) una cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 20 a 237 de SEQ ID NO: 36 y ii) una cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 466 de SEQ ID NO: 31.

En realizaciones aún adicionales, la divulgación se refiere a cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento, en las que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en h409A11, h409A16 y h409A17.

- 50 En realizaciones aún adicionales, la divulgación se refiere a un método de tratamiento de infección crónica en un sujeto mamífero en necesidad del mismo que comprende: administrar una cantidad eficaz de cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento.

- 55 En realizaciones aún adicionales, la divulgación se refiere a un método de tratamiento de cáncer en un sujeto mamífero en necesidad del mismo, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento. En ciertas realizaciones, la cantidad eficaz comprende una dosis de anticuerpo anti-PD-1 humano seleccionado del grupo que consiste en las de 1,0, 3,0 y 10 mg/kg.

Breve descripción de los dibujos

- 60 Las FIGURAS 1A-B muestran datos de estabilidad para formulaciones liofilizadas de h409A11 a pH 5,5 almacenado 5 °C (24 meses).
Las FIGURAS 2A-B muestran datos de estabilidad para formulaciones liofilizadas de h409A11 a pH 5,5 almacenado en condiciones 25H (25 °C, 60 % HR, 12 meses).
65 Las FIGURAS 3A-B muestran datos de estabilidad para formulaciones liofilizadas de h409A11 a pH 5,5 almacenado en condiciones RH4 (40 °C, 75 % HR, 6 meses).

Las FIGURAS 4A-B muestran datos de estabilidad para formulaciones liofilizadas de h409A11 almacenado 5 °C (24 meses).

Las FIGURAS 5A-B muestran datos de estabilidad para formulaciones liofilizadas de h409A11 a pH 5,5 almacenado en condiciones 25H (25 °C, 60 % HR, 6 meses).

Las FIGURAS 6A-B muestran datos de estabilidad para formulaciones liofilizadas de h409A11 a pH 5,5 almacenado en condiciones RH4 (40 °C, 75 % HR, 6 meses).

Las FIGURAS 7A-B muestran datos de estabilidad para formulaciones liofilizadas de h409A11 almacenado 5 °C (24 meses).

Las FIGURAS 8A-B muestran datos de estabilidad para formulaciones liofilizadas de h409A11 en condiciones 25H (25 °C, 60 % HR, 6 meses).

Las FIGURAS 9A-B muestran datos de estabilidad para formulaciones liofilizadas de h409A11 en condiciones RH4 (40 °C, 75 % HR, 6 meses).

Descripción detallada de los dibujos

La presente divulgación proporciona formulaciones de anticuerpos anti-PD-1 y los usos de los mismos para el tratamiento de diversos cánceres y enfermedades infecciosas.

El anticuerpo anti-PD-1 h409A11 es un anticuerpo a modo de ejemplo en las formulaciones estables descritas en el presente documento. Se describen tres anticuerpos monoclonales anti-PD-1 humanizados (es decir, h409A11, h409A16 y h409A17) adecuados para las presentes formulaciones en la publicación de patente co-pendiente WO2008/156712. Adicionalmente, las formulaciones descritas en el presente documento son útiles para tratar ciertos cánceres así como infecciones crónicas. La Tabla 2 proporciona una lista de las secuencias CDR correspondientes para h409A11. La Tabla 6 proporciona una lista de secuencias de anticuerpos anti-PD-1 a modo de ejemplo.

De acuerdo con la presente invención pueden emplearse técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, expresión y purificación de proteínas, anticuerpos y ADN recombinante dentro de la habilidad de la materia. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York; Ausubel *et al.* eds. (2005) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ; Bonifacio *et al.* eds. (2005) *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ; Coligan *et al.* eds. (2005) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ; 15 Coico *et al.* eds. (2005) *Current Protocols in Microbiology*, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ; Coligan *et al.* eds. (2005) *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ; and Enna *et al.* eds. (2005) *Current Protocols in Pharmacology*, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ.; *Nucleic Acid Hybridization*, Hames & Higgins eds. (1985); *Transcription And Translation*, Hames & Higgins, eds. (1984); *Animal Cell Culture* Freshney, 20 ed. (1986); *Immobilized Cells And Enzymes*, IRL Press (1986); Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); y Harlow y Lañe. *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1988).

I. Definiciones

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a cualquier forma de anticuerpo que exhiba la actividad biológica deseada. De esta manera, se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos completamente humanos, etc., siempre que exhiban la actividad biológica deseada.

Adyuvante

Como se usa en el presente documento, el término "adyuvante" se refiere a un compuesto o mezcla que potencia la respuesta inmune a un antígeno. Un adyuvante puede servir como un depósito tisular que libera lentamente el antígeno y también como un activador del sistema linfático que potencia no específicamente la respuesta inmune (Hood *et al.*, *Immunology, Segunda Ed.*, 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, California, p. 384). A menudo, un desafío primario con un antígeno solo, en ausencia de un adyuvante, fallará provocando una respuesta inmune humoral o celular. Los adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund completo, adyuvante de Freund incompleto, saponina, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o de hidrocarburos, hemocianina de lapa californiana y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina, BCG (bacilo de Calmette y Guérin) y *Corynebacterium parvum*. Preferentemente, el adyuvante es farmacéuticamente aceptable.

Citocina

El término "citocina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúa sobre otra

célula como mediadores intercelulares. Los ejemplos de dichas citocinas son linfocinas, monocinas, quimiocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Las citocinas a modo de ejemplo incluyen: IL-2 humanas, IFN- γ , IL-6, TNF α , IL-17 e IL-5.

5 Agente citotóxico

La frase "agente citotóxico" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y y ^{186}Re), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de los mismos.

Usos terapéuticos y métodos

Los agentes bloqueantes de PD-1 incluyen aquellos que se unen específicamente a PD-1 humano, pueden usarse para aumentar, potenciar, estimular o regular positivamente una respuesta inmune. Los sujetos deseables incluyen pacientes humanos en necesidad de potenciación de una respuesta inmune incluyendo pacientes con cáncer y/o una infección vírica crónica.

Cáncer

Los términos "cáncer", "canceroso" o "maligno" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por crecimiento celular sin regular. Los ejemplos de cáncer incluyen pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, leucemia, blastoma y sarcoma. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen carcinoma de células escamosas, mieloma, cáncer de pulmón de células microcíticas, cáncer de pulmón de células no microcíticas, glioma, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, cáncer (del tracto) gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, melanoma, condrosarcoma, neuroblastoma, cáncer pancreático, glioblastoma multiforme, cáncer cervical, cáncer cerebral, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello.

Los agentes bloqueantes de PD-1 incluyen aquellos usados para tratar cáncer (es decir, para inhibir el crecimiento o la supervivencia de células tumorales). Los cánceres preferidos cuyo crecimiento puede inhibirse usando anticuerpos anti-PD-1 tales como el anticuerpo h409A11 anti-PD-1 humanizado e incluyen cánceres que normalmente responden a la inmunoterapia, pero también cánceres que no se han asociado hasta ahora con la inmunoterapia. Los ejemplos no limitantes de cánceres preferidos para el tratamiento incluyen melanoma (por ejemplo, melanoma maligno metastásico), cáncer renal (por ejemplo carcinoma de células claras), cáncer de próstata (por ejemplo adenocarcinoma de próstata refractario hormonal), adenocarcinoma pancreático, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón (por ejemplo cáncer pulmonar de células no microcíticas), cáncer esofágico, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer hepático, cáncer de ovarios, cáncer cervical, cáncer de tiroides, glioblastoma, glioma, leucemia, linfoma y otras neoplasias malignas. Las neoplasias malignas que demuestran liberación de la enfermedad mejorada y supervivencia global en relación a la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor en la biopsia o el material quirúrgico, por ejemplo, melanoma, cáncer colorrectal, hepático, renal, de estómago/esofágico, de mama, de páncreas y de ovarios se abarcan en los métodos y tratamientos descritos en el presente documento. Se sabe que dichos subtipos de cáncer son susceptibles al control inmune por los linfocitos T. Adicionalmente se incluyen neoplasias malignas refractarias o recurrentes cuyo crecimiento puede inhibirse usando los anticuerpos descritos en el presente documento. Los cánceres particularmente preferidos incluyen aquellos caracterizados por la expresión elevada de PD-1 y/o sus ligandos PD-L1 y/o PD-L2 en muestras de tejido ensayadas, incluyendo: cánceres de ovarios, renales, colorrectales, pancreáticos, de mama, hepáticos, gástricos, esofágicos y melanoma. Los cánceres adicionales que pueden beneficiarse del tratamiento con anticuerpos anti-PD-1 tales como el anticuerpo h409A11 anti-PD-1 humanizado incluyen aquellos asociados a infecciones persistentes con virus tales como los virus de la inmunodeficiencia humana, los virus de la hepatitis clase A, B y C, el virus de Epstein Barr, los virus del papiloma humano que se sabe que están causalmente relacionados por ejemplo con el sarcoma de Kaposi, el cáncer hepático, el cáncer nasofaríngeo, el linfoma y los cánceres cervical, vulval, anal, de pene y oral.

Agente quimioterapéutico

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Los anticuerpos anti-PD-1 pueden usarse con uno cualquiera o más agentes quimioterapéuticos adecuados. Los ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida; sulfonatos de alquilo tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; arizidinas tales como benzodopa, carbocina, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietileno fosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina, una sarcodictina;

espongistatina, mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembiquina, fenestrina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo calicheamicina, especialmente galicheamicina gamma II y calicheamicina phill, véase, por ejemplo, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183- 186 (1994); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como el cromóforo de neocarzinostatina y los cromóforos antibióticos de la cromoproteína enediina), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, diarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato, análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromoestanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, triioestano; relleno del ácido fólico tales como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquinona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinano; lonidamina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguantrona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; razoxano; rizoxina; sizofurano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2''-tridlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo paclitaxel y doxetaxel; clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatina y carboplatina; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen agentes anti-hormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción hormonal sobre los tumores tales como antiestrógenos y los moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, ceoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); inhibidores de la aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol, exemestano, formestano, fadrozol, vorozol, letrozol y anastrozol; y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

40 **Agente inhibidor del crecimiento**

Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerígena que sobreexpresa cualquier de los genes identificados en el presente documento, bien *in vitro* o *in vivo*. De esta manera, el agente inhibidor del crecimiento es uno que reduce significativamente el porcentaje de células que sobreexpresan dichos genes en la fase S. Los ejemplos de agentes inhibitorios del crecimiento incluyen agentes que bloquean el avance del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Los bloqueantes de la fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores topo II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina y etopósido. Aquellos agentes que detienen G1 también desbordan la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como dacarbazina, mecloretamina y cisplatina. La información adicional puede encontrarse en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell eyele regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" por Murakami et al. (WB Saunders: Filadelfia, 1995).

55 **Anticuerpos o fragmentos de anticuerpo en combinación con agentes adicionales**

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo anti-PD-1 pueden usarse solos o en combinación con: otros agentes antineoplásicos o agentes inmunogénicos (por ejemplo, células cancerosas atenuadas, antígenos tumorales (incluyendo proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de carbohidratos), células presentadoras de antígenos tales como células dendríticas pulsadas con antígenos derivados de tumor o ácidos nucleicos, citocinas inmunoestimulantes (por ejemplo, IL-2, IFN α 2, GM-CSF) y células transfectadas con genes que codifican citocinas inmunoestimulantes tales como pero no limitado a GM-CSF); tratamientos convencionales del cáncer (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia o cirugía); u otros anticuerpos (incluyendo pero no limitado a anticuerpos para VEGF, EGFR, Her2/neu, receptores de VEGF, otros receptores de factor de crecimiento, CD20, CD40, CD-40L, CTLA-4, OX-40, 4-1BB e ICOS).

Enfermedades infecciosas

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos anti-PD-1 antagonistas pueden usarse también para prevenir o tratar infecciones y enfermedades infecciosas. Estos agentes pueden usarse solos o en combinación con vacunas, para estimular la respuesta inmune a patógenos, toxinas y auto-antígenos. Los anticuerpos o el fragmento de unión a antígeno de los mismos pueden usarse para estimular respuestas inmunes a las infecciones víricas en humanos, incluyendo pero no limitado a: virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la hepatitis clase A, B y C, virus de Epstein Barr, citomegalovirus humano, virus del papiloma humano y virus del herpes. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos anti-PD-1 antagonistas pueden usarse para estimular la respuesta inmune a la infección con parásitos bacterianos o fúngicos y otros patógenos. Las infecciones víricas con hepatitis B y C y VIH se consideran entre estas ser infecciones víricas crónicas.

Como se usa en el presente documento, las frases “fragmento de unión a antígeno PD-1”, “fragmento de unión a antígeno del mismo”, “fragmento de unión del mismo” o “fragmento del mismo” abarcan un fragmento o un derivado de un anticuerpo que retiene aún sustancialmente su actividad biológica de unión a antígeno (PD-1 humano) e inhibe su actividad (por ejemplo, bloqueando la unión de PD-1 a PDL1 y PDL2). Por lo tanto, la frase “fragmento de anticuerpo” o fragmento de unión a PD-1 se refiere a una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión a antígeno o la variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única, por ejemplo sc-Fv; y anticuerpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticuerpos. Normalmente, un fragmento de unión o derivado retiene al menos el 10 % de su actividad inhibitoria de PD-1. Preferentemente, un fragmento de unión o derivado retiene al menos el 25 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 99 % o el 100 % (o más) de su actividad inhibitoria de PD-1, aunque será útil cualquier fragmento de unión con afinidad suficiente para ejercer el efecto biológico deseado. También se pretende que el fragmento de unión a PD-1 pueda incluir variantes que tengan sustituciones de aminoácidos conservativas que no alteren sustancialmente su actividad biológica.

Un “dominio de anticuerpo” es un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional que contiene solamente la región variable de una cadena pesada o la región variable de una cadena ligera. En algunos casos, dos o más regiones V_H se unen covalentemente a un conector peptídico para crear un dominio de anticuerpo bivalente. Las dos regiones V_H de un dominio bivalente de anticuerpo pueden dirigirse al mismo o diferentes antígenos.

Un “anticuerpo bivalente” comprende dos sitios de unión a antígenos. En algunos casos, los dos sitios de unión tienen las mismas especificidades de antígeno. Sin embargo, los anticuerpos bivalentes pueden ser biespecíficos. Como se usa en el presente documento, la frase “anticuerpo biespecífico” se refiere a un anticuerpo, normalmente un anticuerpo monoclonal, que tiene especificidades de unión por al menos dos epítopos antígenicos diferentes. En una realización, los epítopos son del mismo antígeno. En otra realización, los epítopos son de dos antígenos diferentes. Los métodos para fabricar anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden producirse recombinantemente usando la co-expresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Milstein *et al.* (1983) *Nature* 305: 537- 39. Alternativamente, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando unión química. Véase, por ejemplo, Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81. Los anticuerpos biespecíficos incluyen fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Véase, por ejemplo Holliger *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-48, Gruber *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:5368.

Como se usa en el presente documento, la frase anticuerpo “Fv de cadena única” o “scFv” se refiere a fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios V_H y V_L de anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una cadena de polipéptido única. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión de antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun (1994) *THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315.

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento también incluyen dominios de anticuerpo únicos camelizados. Véase, por ejemplo, Muyldermans *et al.* (2001) *Trends Biochem. Sci.* 26:230; Reichmann *et al.* (1999) *J. Immunol. Methods* 231:25; documento WO 94/04678; documento WO 94/25591; Pat. de EE.UU. N.º 6.005.079). También se incluyen los dominios de anticuerpos únicos que comprenden dos dominios V_H con modificaciones de tal manera que se formen dominios de anticuerpo únicos.

Como se usa en el presente documento, el término “diacuerpos” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptido (V_H-V_L o V_L-V_H). Usando un conector que sea demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se fuerzan a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en el documento EP 404.097; el documento WO 93/11161; y Holliger *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90: 6444-6448. Para una revisión de variantes de anticuerpo diseñadas por ingeniería genética véase generalmente Holliger y Hudson (2005) *Nat.*

Biotechnol. 23:1126-1136.

Como se usa en el presente documento, la frase "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (por ejemplo murinos) así como anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos contienen mínima secuencia derivada de inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos de los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas de las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente aquella de una inmunoglobulina humana. Las formas humanizadas de anticuerpos de roedores comprenderán generalmente las mismas secuencias CDR de los anticuerpos de roedor parentales, aunque pueden incluirse ciertas sustituciones de aminoácidos para aumentar la afinidad, aumentar la estabilidad del anticuerpo humanizado o por otras razones.

Los anticuerpos de la presente divulgación también incluyen anticuerpos con regiones Fc modificadas (o bloqueadas) para proporcionar funciones efectoras alteradas. Véase, por ejemplo, Pat. de EE.UU. N.º 5.624.821; documento W02003/086310; documento W02005/120571; documento W02006/0057702; Presta (2006) *Adv. Drug Delivery Rev.* 58:640-656. Dicha modificación puede usarse para potenciar o suprimir diversas reacciones del sistema inmune, con posibles efectos beneficiosos en el diagnóstico y la terapia. Las alteraciones de la región Fc incluyen cambios de aminoácidos (sustituciones, deleciones e inserciones), glucosilación o desglucosilación y añadir múltiples Fc. Los cambios a los Fc también pueden alterar la vida media de los anticuerpos en los anticuerpos terapéuticos, y una vida media más larga resultaría en una dosificación menos frecuente, con la conveniencia concomitante aumentada y el uso disminuido de material. Véase Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731 en 734-35.

La frase "anticuerpo completamente humano" se refiere a un anticuerpo que comprende solamente secuencias de proteína inmunoglobulina humana. Un anticuerpo completamente humano puede contener cadenas de carbohidrato murinas si se produce en un ratón, en una célula de ratón o en un hibridoma derivado de una célula de ratón. De forma similar, "anticuerpo de ratón" se refiere a un anticuerpo que comprende solamente secuencias de inmunoglobulina. Un anticuerpo completamente humano puede generarse en un ser humano, en un animal transgénico que tiene secuencias de la línea germinal de inmunoglobulina humana, por visualización de fagos u otros métodos de biología molecular.

Como se usa en el presente documento, la frase "región hipervariable" se refiere a los restos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, los restos 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) y 89-97 (CDRL3) en el dominio variable de cadena ligera y los restos 31-35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) y 95-102 (CDRH3) en el dominio variable de cadena pesada (Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) y/o aquellos restos de un "bucle hipervariable" (es decir, los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada (Chothia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917). Como se usa en el presente documento, la frase "región marco" o los restos "FR" se refiere a aquellos restos de dominio variable distintos de los restos de la región hipervariable definidos en el presente documento como restos CDR. La numeración de restos anterior se refiere al sistema de numeración de Kabat y no corresponde necesariamente en detalle a la numeración de secuencia del Listado de Secuencias que acompaña.

"Variantes modificadas conservativamente" o "sustitución conservativa" se refieren a sustituciones de aminoácidos que se conocen por aquellos expertos en la materia y pueden realizarse generalmente sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante, incluso en regiones esenciales del polipéptido. Dichas sustituciones a modo de ejemplo se realizan preferentemente de acuerdo con aquellas expuestas en la Tabla 1 como sigue:

Tabla 1
Sustituciones conservativas de aminoácidos a modo de ejemplo

Resto original	Sustitución conservativa
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val

Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser(S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr(Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Además, aquellos expertos en la materia reconocerán que, en general, las sustituciones de aminoácidos únicos en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica. Véase, por ejemplo, Watson *et al.* (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4a Edición).

5 La frase “consiste esencialmente en”, o variaciones tales como “consisten esencialmente en” o “que consiste esencialmente en”, como se usa a lo largo de toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, indica la inclusión de cualquier elemento o grupo de elementos recitados y la inclusión opcional de otros elementos, de naturaleza similar o diferente a la de los elementos recitados, que no cambian materialmente las propiedades básicas o
10 novedosas del régimen de dosificación, el método o la composición especificados. Como un ejemplo no limitante, un compuesto de unión que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos recitada puede incluir también uno o más aminoácidos, incluyendo sustituciones de uno o más restos de aminoácidos, que no afectan materialmente a las propiedades del compuesto de unión.

15 “Afección inmune” o “trastorno inmune” abarca, por ejemplo, inflamación patológica, un trastorno inflamatorio y un trastorno o una enfermedad autoinmunes. “Afección inmune” también se refiere a infecciones, infecciones persistentes y afecciones proliferativas, tales como cáncer, tumores y angiogénesis, incluyendo infecciones, tumores y cánceres que resisten la erradicación por el sistema inmune. “Afección cancerosa” incluye, por ejemplo, cáncer, células cancerosas, tumores, angiogénesis y afecciones precancerosas tales como displasia.

20 El anticuerpo, o la composición de unión derivada del sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, de la formulación o el método contemplados se une a su antígeno con una afinidad que es al menos dos veces mayor, preferentemente al menos diez veces mayor, más preferentemente al menos 20 veces mayor y lo más preferentemente 100 veces mayor que la afinidad con los antígenos no relacionados. En una realización preferida el anticuerpo tendrá una
25 afinidad que es mayor de aproximadamente 10^9 litros/mol, como se determina, por ejemplo, por análisis Scatchard. Munsen *et al.* (1980) *Analyt. Biochem.* 107:220-239.

Definiciones de composiciones farmacéuticas

30 La frase “agentes de volumen” comprende agentes que proporcionan la estructura del producto seco por congelación. Los ejemplos comunes usados para agentes de volumen incluyen manitol, glicina, lactosa y sacarosa. Además de proporcionar una torta farmacéuticamente elegante, los agentes de volumen pueden impartir también cualidades útiles con respecto a modificar la temperatura de colapso, proporcionar protección a congelación-descongelación y potenciar la estabilidad de la proteína durante el almacenamiento a largo plazo. Estos agentes
35 pueden servir también como modificadores de la tonicidad.

El término “tampón” abarca aquellos agentes que mantienen el pH de la solución en un intervalo aceptable antes de la liofilización y pueden incluir succinato (sódico o potásico), histidina, fosfato (sódico o potásico), Tris (tris (hidroxietil) aminometano), dietanolamina, citrato (sódico) y similares. El tampón de esta divulgación tiene un pH en
40 un intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0; y preferentemente tiene un pH de aproximadamente 5,5. Los ejemplos de tampones que controlarán el pH en este intervalo incluyen succinato (tales como succinato sódico), gluconato, histidina, citrato y otros tampones de ácido orgánico. Al llegar a la formulación a modo de ejemplo, se exploraron los tampones histidina, acetato y citrato en el intervalo de pH de 5,0-6,0 para su adecuabilidad. Los sistemas tampón de histidina y acetato se comportaron mejor que el sistema citrato. El tampón
45 histidina es un sistema tampón preferido, porque los sistemas de tampón acetato no son compatibles con el proceso de liofilización.

El término “crioprotectores” incluye generalmente agentes que proporcionan estabilidad a la proteína contra estreses inducidos por congelación, presumiblemente excluyéndose de forma preferencial de la superficie proteica. También
50 pueden ofrecer protección durante el secado primario y secundario y el almacenamiento del producto a largo plazo. Los ejemplos son polímeros tales como dextrano y polietilenglicol; azúcares tales como sacarosa, glucosa, trehalosa y lactosa; tensioactivos tales como polisorbatos; y aminoácidos tales como glicina, arginina y serina.

Los términos “liofilización”, “liofilizado” y “secado por congelación” se refieren a un proceso por el que el material a
55 secarse se congela en primer lugar y después el hielo o el disolvente congelado se retira por sublimación en un

ambiente al vacío. Puede incluirse un excipiente en formulaciones pre-liofilizadas para potenciar la estabilidad del producto liofilizado tras el almacenamiento.

El término “lioprotector” incluye agentes que proporcionan estabilidad a la proteína durante el proceso de secado o “deshidratación” (ciclos de secado primario y secundario), presumiblemente proporcionando una matriz vítrea amorfa y uniéndose con la proteína a través de unión de hidrógeno, reemplazando las moléculas de agua que se retiran durante el proceso de secado. Esto ayuda a mantener la conformación de la proteína, a minimizar la degradación proteica durante el ciclo de liofilización y a mejorar la estabilidad del producto a largo plazo. Los ejemplos incluyen polioles o azúcares tales como sacarosa y trehalosa.

La frase “formulación farmacéutica” se refiere a preparaciones que están en dicha forma para permitir que los principios activos sean eficaces y que no contiene componentes adicionales que sean tóxicos a los sujetos a los que la formulación se administraría.

Los excipientes “farmacéuticamente aceptables” (vehículos, aditivos) son aquellos que pueden administrarse razonablemente a un sujeto mamífero para proporcionar una dosis eficaz del principio activo empleado.

“Tiempo de reconstitución” es el tiempo que se requiere para rehidratar una formulación liofilizada con una solución a una solución clarificada sin partículas.

Una formulación “estable” es una en la que la proteína en la misma retiene esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica tras el almacenamiento. Diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad proteica están disponibles en la técnica y se revisan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 (1993). La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado.

Una formulación de anticuerpo liofilizada “estable” es una formulación de anticuerpo sin cambios significativos observados a una temperatura refrigerada (2-8 °C) durante al menos 12 meses, preferentemente 2 años y más preferentemente 3 años; o a una temperatura ambiente (23-27 °C) durante al menos 3 meses, preferentemente 6 meses y más preferentemente 1 año. Los criterios típicos aceptables para estabilidad son como sigue. No más del 10 %, preferentemente el 5 %, de monómero de anticuerpo se degrada según se mide por SEC-HPLC. La solución rehidratada es normalmente incolora o transparente a claramente opalescente por análisis visual. La concentración, el pH y la osmolalidad de la formulación no tienen más de un 10^{+/-} % de cambio. La potencia está normalmente dentro de un intervalo del 50-150 % de la referencia. No se observa más de un 10 %, preferentemente un 5 % de recorte. No se forma más de un 10 %, preferentemente un 5 % de agregación.

Una formulación de anticuerpo farmacéutica “estable” (incluyendo una formulación liofilizada, un líquido reconstituido, así como una formulación líquida que es una formulación “final” (es decir, no se ha liofilizado previamente) es una formulación de anticuerpo farmacéutica sin cambios significativos observados a una temperatura refrigerada (2-8 °C) durante al menos 3 meses, preferentemente 6 meses y más preferentemente 1 año e incluso más preferentemente hasta a lo largo de 2 años. Adicionalmente, una formulación líquida “estable” incluye una que exhibe características deseadas a temperaturas que incluyen a 25 °C y 40 °C durante periodos que incluyen 1 mes, 3 meses, 6 meses, 12 meses y/o 24 meses. Los criterios típicos aceptables para la estabilidad son como sigue. normalmente, no se degrada más de aproximadamente el 10 %, preferentemente el 5 % del monómero de anticuerpo como se mide por SEC-HPLC. La formulación de anticuerpo farmacéutica es incolora, o transparente a claramente opalescente por análisis visual. La concentración, el pH y la osmolalidad de la formulación no tienen más de un 10^{+/-} % de cambio. La potencia está normalmente dentro de un intervalo del 50-150 de la referencia. normalmente no se observa más de un 10 %, preferentemente un 5 % de recorte. No se forma más de un 10 %, preferentemente un 5 % de agregación.

Un anticuerpo “retiene su estabilidad física” en una formulación farmacéutica si no muestra aumento significativo de agregación, precipitación y/o desnaturalización tras el examen visual del color y/o la claridad o como se mide por dispersión de luz UV, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y dispersión de luz dinámica. Los cambios de la conformación de proteínas pueden evaluarse por espectroscopía de fluorescencia, que determina la estructura terciaria de la proteína y por espectroscopía FTIR, que determina la estructura secundaria de la proteína.

Un anticuerpo “retiene su estabilidad química” en una formulación farmacéutica si no muestra alteración química significativa. La estabilidad química puede evaluarse detectando y cuantificando formas químicamente alteradas de la proteína. Los procesos de degradación que normalmente alteran la estructura química de la proteína incluyen hidrólisis o corte (evaluados por métodos tales como cromatografía de exclusión por tamaño y SDS-PAGE), oxidación (evaluada por métodos tales como mapeo peptídico junto con espectroscopía de masas o MALDI/TOF/MS), desamidación (evaluada por métodos tales como cromatografía de intercambio iónico, isoelectroenfoque capilar, mapeo peptídico, medición de ácido isoaspártico) e isomerización (evaluado midiendo el contenido de ácido isoaspártico, mapeo peptídico, etc.).

Un anticuerpo “retiene su actividad biológica” en una formulación farmacéutica, si la actividad biológica del

anticuerpo en un tiempo dado está dentro de un intervalo predeterminado de la actividad biológica exhibida en el momento en que se preparó la formulación farmacéutica. La actividad biológica de un anticuerpo puede determinarse, por ejemplo, por ensayo de unión a antígenos.

El término "isotónico" significa que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas tendrán generalmente una presión osmótica de aproximadamente 270-328 mOsm. La presión ligeramente hipotónica es 250-269 y la presión ligeramente hipertónica es de 328-350 mOsm. La presión osmótica puede medirse, por ejemplo, usando una presión de vapor o un osmómetro de tipo congelación por hielo.

Modificadores de tonicidad: Se usan sales (NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, etc.) como modificadores de la tonicidad para controlar la presión osmótica. Además, los crioprotectores/lioprotectores y/o agentes de volumen tales como sacarosa, manitol, glicina, etc. pueden servir como modificadores de la tonicidad.

Métodos analíticos

Los métodos analíticos adecuados para evaluar la estabilidad del producto incluyen cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), ensayo de dispersión dinámica de luz (DLS), calorimetría diferencial de barrido (DSC), cuantificación iso-asp, potencia, UV a 340 nm, espectroscopía UV y FTIR. SEC (J. Pharm. Scien., 83:1645-1650, (1994); Pharm. Res., 11:485 (1994); J. Pharm. Bio. Anal., 15:1928 (1997); J. Pharm. Bio. Anal., 14:1133-1140 (1986)) mide el monómero en porcentaje en el producto y da información de la cantidad de agregados solubles. DSC (Pharm. Res., 15:200 (1998); Pharm. Res., 9:109 (1982)) da información de la temperatura de desnaturalización de proteínas y la temperatura de transición vítrea. DLS (American Lab., November (1991)) mide el coeficiente de difusión medio y da información de la cantidad de agregados solubles e insolubles. UV a 340 nm mide la intensidad de la luz dispersada a 340 nm y da información acerca de las cantidades de agregados solubles e insolubles. La espectroscopía UV mide la absorbancia a 278 nm y da información de la concentración de proteína. FTIR (Eur. J. Pharm. Biopharm., 45:231 (1998); Pharm. Res., 12:1250 (1995); J. Pharm. Scien., 85:1290 (1996); J. Pharm. Scien., 87:1069 (1998)) mide el espectro IR en la región amida uno y da información de la estructura secundaria proteica.

El contenido iso-asp en las muestras se mide usando el Sistema de Detección de Isoaspartato Isoquant (Promega). El kit usa la enzima Proteína Isoaspartil Metiltransferasa (PIMT) para detectar específicamente la presencia de restos de ácido isoaspártico en una proteína diana. PIMT cataliza la transferencia de un grupo metilo de S-adenosil-L-metionina a ácido isoaspártico en la posición alfa-carboxilo, generando S-adenosil-L-homocisteína (SAH) en el proceso. Esto es una molécula relativamente pequeña y habitualmente puede asilarse y cuantificarse por HPLC en fase inversa usando los patrones de SAH HPLC proporcionados en el kit.

La potencia o bioidentidad de un anticuerpo puede medirse por su capacidad de unirse a su antígeno. La unión específica de un anticuerpo a su antígeno puede cuantificarse por cualquier método conocido por aquellos expertos en la materia, por ejemplo, un inmunoensayo, tal como ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).

Una formulación "reconstituida" es una que se ha preparado disolviendo una formulación de proteína liofilizada en un diluyente de tal manera que la proteína se disperse en la formulación reconstituida. La formulación reconstituida es adecuada para la administración, por ejemplo, administración parenteral y puede ser adecuada opcionalmente para administración subcutánea.

Anticuerpos anti-PD-1 humanizados

Las construcciones de ADN que codifican las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos humanizados h409A11, h409A16 y h409A17 se describen en el documento WO2008/156712.

La memoria descriptiva escrita anterior se considera ser suficiente para permitir a un experto en la materia practicar la invención. La presente invención no ha de limitarse en el alcance por el cultivo depositado, ya que la realización depositada se pretende como una única ilustración de un aspecto de la invención y cualquier cultura que sea funcionalmente equivalente está dentro del alcance de la presente invención. El depósito del material en el presente documento no constituye una admisión de que la descripción escrita contenida en el presente documento sea inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni ha de construirse limitando el alcance de las reivindicaciones a la ilustración específica que representa. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de aquellas mostradas y descritas en el presente documento serán evidentes para aquellos expertos en la materia de la descripción anterior y caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Se proporcionan secuencias para anticuerpos anti-PD-1 humanos a modo de ejemplo; se proporciona una tabla resumen de las secuencias en la Tabla 6. Las CDR se proporcionan bajo identificadores de secuencia separados, como se indica en la Tabla 2 para h409A11.

De forma ordinaria, las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-PD-1 humanizado tendrán una

secuencia de aminoácidos que tenga al menos el 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de anticuerpo humanizado original de la cadena pesada o bien la ligera más preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 85 %, más preferentemente al menos el 90 % y más preferentemente al menos el 95, el 98 o el 99 %. La identidad u homología con respecto a esta secuencia se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los restos anti-PD-1 humanizados, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr la identidad máxima de secuencia en porcentaje y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Ninguna de las extensiones, deleciones o inserciones N terminales, C terminales o internas en la secuencia del anticuerpo deben construirse afectando a la identidad u homología de secuencia.

El anticuerpo humanizado puede seleccionarse de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo IgG. Puede usarse cualquier isótopo de IgG, incluyendo IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. Pueden unirse diferentes dominios constantes a las regiones V_L y V_H humanizadas proporcionadas en el presente documento. Por ejemplo, si un uso destinado particular de un anticuerpo (o fragmento) de la presente divulgación fuera para llamar para funciones efectoras alteradas, puede usarse un dominio constante de cadena pesada distinto de IgG1. Aunque los anticuerpos IgG1 proporcionan larga vida media y funciones efectoras, tales como la activación del complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, dichas actividades pueden no ser deseables para todos los usos del anticuerpo. En dichos casos, puede usarse, por ejemplo, un dominio constante IgG4.

Igualmente puede usarse cualquier clase de cadena ligera en las composiciones y métodos del presente documento. Específicamente, kappa, lambda o variantes de las mismas son útiles en las presentes composiciones y métodos.

Los restos CDR y FR se determinan de acuerdo con la definición de Kabat de secuencia convencional. Kabat *et al.* (1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda Md.

Las secuencias señal, o las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las secuencias señal, pueden unirse al N terminal de las cadenas de aminoácidos respectivas para crear una proteína precursora para la secreción desde una célula hospedadora. Las secuencias señal alternativas pueden usarse también y pueden encontrarse varias en "SPdb: a Signal Peptide Database." Choo *et al.* (2005) *BMC Bioinformatics* 6:249.

TABLA 2
Secuencias CDR de H409A11

Anticuerpo	Secuencia CDR	SEQ ID NO:
H409A11	CDR1 de cadena ligera (equivalente a CDR1 de cadena ligera hPD-1.09A) RASKGVSTSGYSYLH	15
H409A11	CDR2 de cadena ligera (equivalente a CDR2 de cadena ligera hPD-1.09A) LASYLES	16
H409A11	CDR3 de cadena ligera (equivalente a CDR3 de cadena ligera hPD-1.09A) QHSRDPLT	17
H409A11	CDR1 de cadena pesada (equivalente a CDR1 de cadena pesada hPD-1.09A) NYMY	18
H409A11	CDR2 de cadena pesada (equivalente a CDR2 de cadena pesada hPD-1.09A) GINPSNGGTNFNEKFKN	19
H409A11	CDR3 de cadena pesada (equivalente a CDR3 de cadena pesada hPD-1.09A) RDYRFDMGFDY	20

Actividad biológica de anti-PD-1 humanizado

Las formulaciones de la presente divulgación incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos que son biológicamente activos cuando se reconstituyen o están en forma líquida. Como se usa en el presente documento, la frase "biológicamente activo" se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es capaz de unirse al epítipo antigénico deseado y directa o indirectamente ejercer un efecto biológico. Normalmente, estos efectos resultan del fallo de PD-1 a unirse a sus ligandos. Como se usa en el presente documento, el término "específica" se refiere a la unión selectiva del anticuerpo al epítipo de antígeno diana. Los anticuerpos pueden ensayarse para la especificidad de unión comparando la unión a PD-1 a antígenos irrelevantes o mezclas de antígenos en un conjunto dado de condiciones.

Composiciones farmacéuticas liofilizadas

Las formulaciones liofilizadas de proteínas terapéuticas proporcionan varias ventajas. Las formulaciones liofilizadas en general ofrecen mejor estabilidad química que las formulaciones en solución y de esta manera una vida media aumentada. Una formulación liofilizada puede reconstituirse también a concentraciones diferentes dependiendo de factores clínicos, tales como la ruta de administración o la dosificación. Por ejemplo, una formulación liofilizada puede reconstituirse a una alta concentración (es decir, en un volumen pequeño) si es necesario para administración subcutánea, o a una concentración menor si se administra intravenosamente. También pueden ser necesarias altas concentraciones si la dosificación alta se requiere para un sujeto particular, particularmente si se administra subcutáneamente donde el volumen de inyección debe minimizarse. Una formulación tal de anticuerpo liofilizada se desvela en la Pat. de EE.UU. N.º 6.267.958. Las formulaciones liofilizadas de otra proteína terapéutica se desvelan en la Pat. de EE.UU. N.º 7.247.707.

Normalmente, la formulación liofilizada se prepara en anticipación de reconstitución a concentración alta de producto de fármaco (DP, en una realización a modo de ejemplo anticuerpo h409A11 anti-PD-1 humanizado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo), es decir en anticipación de reconstitución en un volumen bajo de agua. La dilución posterior con agua o tampón isotónico puede usarse después fácilmente para diluir el DP a una concentración menor. Normalmente, los excipientes se incluyen en una formulación liofilizada de la presente divulgación a niveles que darán como resultado una formulación toscamente isotónica cuando se reconstituye a una alta concentración de DP, por ejemplo para administración subcutánea. La reconstitución en un volumen más grande de agua para dar una concentración menor de DP necesariamente reducirá la tonicidad de la solución reconstituida, pero dicha reducción puede ser de poca significancia en la administración no subcutánea, por ejemplo, intravenosa. Si la isotonicidad se desea a una concentración más baja de DP, el polvo liofilizado puede reconstituirse en el volumen bajo convencional de agua y después diluirse adicionalmente con diluyente isotónico, tal como el 0,9 % de cloruro sódico.

En una realización de la presente divulgación, el anticuerpo anti-PD-1 humanizado (o un fragmento de unión a antígeno del mismo) se formula como un polvo liofilizado para reconstituir y utilizar para administración intravenosa. Las formulaciones a modo de ejemplo se describen en las Tablas 3-4 y en las Figuras 1-9. En ciertas realizaciones, el anticuerpo (o el fragmento de unión a antígeno del mismo) se proporciona a aproximadamente 50 mg/vial y se reconstituye con agua estéril para la inyección antes de su uso. Si se desea, el anticuerpo reconstituido puede diluirse asépticamente con una Inyección USP de Cloruro Sódico al 0,9 % en un recipiente IV estéril. El pH diana de la formulación reconstituida es $5,5 \pm 0,5$. En diversas realizaciones, la formulación liofilizada de la presente divulgación permite la reconstitución del anticuerpo anti-PD-1 a altas concentraciones, tales como aproximadamente 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 100 o más mg/ml.

La presente divulgación proporciona en ciertas realizaciones una formulación liofilizada que comprende anticuerpo anti-PD-1 humanizado, un tampón histidina a aproximadamente pH 5,5, o a aproximadamente pH 5,0, por ejemplo a aproximadamente 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 o 6,0.

Cuando se recita un intervalo de valores de pH, tales como “un pH entre pH 5,5 y 6,0”, el intervalo pretende ser inclusivo de los valores recitados. Salvo que se indique de otra manera, el pH se refiere al pH después de la reconstitución de las formulaciones liofilizadas de la presente divulgación. El pH se mide normalmente a 25 °C usando un pH metro de bulbo de vidrio convencional. Como se usa en el presente documento, una solución que comprende “tampón histidina a pH X” se refiere a una solución a pH X y que comprende el tampón histidina, es decir, el pH pretende referirse al pH de la solución.

La formulación en la Tabla 3 refleja el peso de los componentes en una formulación en lote, como liofilizado en los viales y como reconstituido. Las formulaciones liofilizadas están por definición esencialmente secas y, de esta manera, el concepto de concentración no es útil describiéndolas. Describir una formulación liofilizada en términos del peso de los componentes en un vial de dosis unitaria es más útil, pero es problemático porque varía para diferentes dosis o tamaños de vial. Al describir las formulaciones liofilizadas de la presente invención, es útil expresar la cantidad de un componente como la relación del peso del componente en comparación con el peso de la sustancia de fármaco (DS) en la misma muestra (por ejemplo un vial). Esta relación puede expresarse como un porcentaje. Dichas relaciones reflejan una propiedad intrínseca de las formulaciones liofilizadas de la presente invención, independientes del tamaño del vial, la dosificación y el protocolo de reconstitución.

En otras realizaciones, la formulación liofilizada de anticuerpo anti-PD-1 humano, o un fragmento de unión al mismo, se define en términos de la solución de pre-liofilización usada para fabricar la formulación liofilizada, tal como la solución de pre-liofilización. En una realización la solución de pre-liofilización comprende anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, a una concentración de aproximadamente 25 mg/ml. Dichas soluciones de pre-liofilización pueden estar a pH 4,4 – 5,2 (incluyendo aproximadamente 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1 y 5,2), por ejemplo aproximadamente pH 4,8 o aproximadamente pH 5,5.

En aún otras realizaciones, la formulación liofilizada de anticuerpo anti-PD-1, o el fragmento de unión a antígeno, se define en términos de la solución reconstituida generada a partir de la formulación liofilizada, tal como la solución

reconstituida desvelada en la Tabla 4.

Las soluciones reconstituidas pueden comprender anticuerpo, o fragmento de unión del mismo a concentraciones de aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 80, 90 o 100 mg/ml o concentraciones más altas tales como 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml o hasta aproximadamente 300 mg/ml. Dichas soluciones reconstituidas pueden estar a aproximadamente pH 5,5 o variar de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente 6,0.

Las formulaciones liofilizadas de la presente invención se forman por liofilización (secado por congelación) de una solución de pre-liofilización. El secado por congelación se logra congelando la formulación y posteriormente sublimando agua a una temperatura adecuada para el secado primario. En esta condición, la temperatura del producto está por debajo del punto eutéctico o la temperatura de colapso de la formulación. Normalmente, la temperatura útil para el secado primario variará de aproximadamente -30 a 25 °C (con la condición de que el producto se mantenga congelado durante el secado primario) a una presión adecuada, que varía normalmente de aproximadamente 6,66 a 33,33 Pa (50 a 250 mTorr). La formulación, el tamaño y el tipo del envase que mantiene la muestra (por ejemplo, vial de vidrio) y el volumen del líquido dictarán el tiempo requerido para secar, cuyo intervalo varía de unas pocas horas a varios días (por ejemplo 40-60 h). Una fase de secado secundaria puede llevarse a cabo a aproximadamente 0-40 °C, dependiendo principalmente del tipo y el tamaño del envase y el tipo de proteína empleada. El tiempo de secado secundario se dicta por el nivel de humedad residual deseado en el producto y normalmente toma al menos aproximadamente 5 horas. Normalmente, el contenido de humedad de una formulación liofilizada es menos de aproximadamente el 5 % y preferentemente menos de aproximadamente el 3 %. La presión puede ser la misma que aquella empleada durante la etapa de secado primario. Las condiciones de secado por congelación pueden variarse dependiendo de la formulación y el tamaño del vial.

En algunos casos, puede ser deseable liofilizar la formulación de proteína en el envase en el que la reconstitución de la proteína ha de llevarse a cabo para evitar una etapa de transferencia. El envase en este caso puede ser, por ejemplo, un vial de 3, 5, 10, 20, 50 o 100 cm³.

Las formulaciones liofilizadas de la presente invención se reconstituyen antes de la administración. La proteína puede reconstituirse a una concentración de aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 80, 90 o 100 mg/ml o concentraciones mayores tales como 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml o 300 mg/ml hasta aproximadamente 500 mg/ml. Las concentraciones altas de proteína son particularmente útiles cuando se pretende la administración subcutánea de la formulación reconstituida. Sin embargo, para otras vías de administración, tales como la administración intravenosa, pueden desearse concentraciones menores de la proteína (por ejemplo de aproximadamente 5-50 mg/ml).

La reconstitución tiene lugar generalmente a una temperatura de aproximadamente 25 °C para asegurar la hidratación completa, aunque pueden emplearse otras temperaturas como se desee. El tiempo requerido para la reconstitución dependerá, por ejemplo, del tipo de diluyente, la cantidad de excipiente o excipientes y la proteína. Los diluyentes a modo de ejemplo incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWF1), una solución tamponada de pH (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

Las formulaciones liofilizadas de la presente invención se esperan ser estables durante al menos aproximadamente 36 meses (basándose en los datos de estabilidad de las Figuras 1-9). Además, la formulación líquida se espera que exhiba estabilidad durante al menos 24 meses, basándose en datos de 24 meses de estabilidad a partir de la formulación h409A11 reconstituida en tubos de polipropileno a 2-8 °C.

En línea con los resultados mostrados en las Figuras 1-9, la estabilidad se ha observado a través de 2 años para una formulación reconstituida refrigerada de h409A11. Las muestras de 2 ml en tubos de polipropileno se almacenaron a 5 °C y las condiciones 25H y RH4 y se ensayaron a periodos iniciales, 1, 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses. Esta formulación de h409A11 reconstituida tiene los mismos sustituyentes en la misma concentración que una formulación de h409A11 líquida (es decir, una formulación que no se liofilizó) y se espera que la estabilidad sea la misma.

Composiciones farmacéuticas líquidas

Una formulación de anticuerpo líquida puede fabricarse tomando la sustancia de fármaco (por ejemplo, anti-PD-1 humanizado) que está en forma líquida (por ejemplo, h409A11 en una formulación farmacéutica acuosa) e intercambiando con tampón en el tampón deseado como la última etapa del proceso de purificación. No hay etapa de liofilización en esta realización. La sustancia de fármaco en el tampón final se concentra a una concentración deseada. Los excipientes tales como sacarosa y polisorbato 80 se añaden a la sustancia de fármaco y se diluye usando el tampón apropiado a una concentración de proteína final. La sustancia de fármaco formulada final se filtra usando filtros de 0,22 µm y se carga en un envase final (por ejemplo, viales de vidrio). Dicha formulación líquida se ejemplifica por una formulación líquida final que comprende histidina 10 mM pH 5,5, 7 % de sacarosa, 0,02 % de polisorbato 80 y 25 mg/ml de h409A11.

Están disponibles diversas referencias bibliográficas para facilitar la selección de vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences* y *U.S. Pharmacopeia: National Formulary*, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984); Hardman *et al.* (2001) *Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, Nueva York, NY; Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams y Wilkins, Nueva York, NY; Avis *et al.* (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, NY; 10 Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, NY; Lieberman *et al.* (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY; Weiner y Kotkoskie (2000) *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY.

La toxicidad es una consideración al seleccionar la dosificación apropiada de un agente terapéutico, tal como un anticuerpo anti-PD-1 humanizado (o un fragmento de unión a antígeno del mismo). La toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones de anticuerpo pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL_{50} (la dosis letal al 50 % de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación de DL_{50} y DE_{50} . Se prefieren los anticuerpos que exhiben altos índices terapéuticos. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivos celulares y los estudios animales pueden usarse formulando un intervalo de dosificación para su uso en humanos. La dosificación de dichos compuestos cae preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o sin toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada.

Las rutas de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración parenteral, incluyendo intramuscular, intradérmica, subcutánea, inyecciones intramedulares, así como intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intraperitoneal. Los fármacos pueden administrarse en diversos modos convencionales, tales como inyección intraperitoneal, parenteral, intraarterial o intravenosa. Los modos de administración en los que el volumen de la solución debe limitarse (por ejemplo, administración subcutánea) requieren una formulación liofilizada para permitir la reconstitución a alta concentración.

Alternativamente, uno puede administrar el anticuerpo de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, a través de la inyección del anticuerpo directamente en una lesión inducida por patógenos caracterizada por inmunopatología, a menudo en una formulación de depósito o de liberación sostenida. Adicionalmente, uno puede administrar el anticuerpo en un sistema de administración dirigido a diana, por ejemplo, en un liposoma recubierto con un anticuerpo específico de tejido, marcando como diana, por ejemplo, la lesión inducida por patógeno caracterizada por inmunopatología. Los liposomas se marcarán como diana y se tomarán selectivamente por el tejido afectado.

Seleccionar un régimen de administración para un producto terapéutico depende de varios factores, incluyendo la tasa de rotación del suero o del tejido de la entidad, el nivel de síntomas, la inmunogenicidad de la entidad y la accesibilidad de las células diana en la matriz biológica. Preferentemente, un régimen de administración maximiza la cantidad del producto terapéutico administrado al paciente consistente con un nivel aceptable de efectos laterales. En consecuencia, la cantidad de producto biológico administrado depende en parte de la entidad particular y la gravedad de la afección a tratarse. Hay disponibles guías en la selección de dosis apropiadas de anticuerpos, citocinas y moléculas pequeñas. Véase, por ejemplo, Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, RU; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom *et al.* (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon *et al.* (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitz *et al.* (2000) *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky *et al.* (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602; Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 57a Ed); Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57a edición (Noviembre 2002).

La determinación de la dosis apropiada se realiza por el médico, por ejemplo, usando parámetros o factores conocidos o sospechados en la técnica que afecten al tratamiento o predigan que afecten al tratamiento. La dosificación apropiada ("cantidad terapéuticamente eficaz") de la proteína dependerán, por ejemplo, de la afección a tratarse, la gravedad y el transcurso de la afección, ya sea que la proteína se administre para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta a la proteína, el tipo de proteína usada y la discreción del médico que atiende. Generalmente, la dosis comienza con una cantidad de alguna manera menor que la dosis óptima y se aumenta por pequeños aumentos en lo sucesivo hasta que se logra el efecto deseado u óptimo con respecto a ningún efecto secundario negativo. Las medidas diagnósticas importantes incluyen aquellas de los síntomas de, por ejemplo, la inflamación o el nivel de citocinas inflamatorias producidas. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente una vez o repetidamente. El anticuerpo puede administrarse solo o junto con otros fármacos o terapias.

Una formulación de anticuerpo farmacéutica puede administrarse por infusión continua o por dosis a intervalos de, por ejemplo, un día, 1-7 veces a la semana, una semana, dos semanas, tres semanas, mensualmente,

bimensualmente, etc. Un protocolo preferido de dosis es uno que implica la máxima dosis o frecuencia de dosis que evita efectos secundarios indeseables significativos. Una dosis semanal total es generalmente al menos 0,05 µg/kg, 0,2 µg/kg, 0,5 µg/kg, 1 µg/kg, 10 µg/kg, 100 µg/kg, 0,2 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg de peso corporal o más. Véase, por ejemplo, Yang *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 349:427-434; Herold *et al.* (2002) *New Engl. J. Med.* 346:1692-1698; 10 Liu *et al.* (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67:451-456; Portielji *et al.* (20003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:133-144. La dosis deseada de un producto terapéutico de molécula pequeña, por ejemplo un péptido mimético, un producto natural o químico orgánico, es aproximadamente la misma que para un anticuerpo o un polipéptido, en una base en moles/kg.

En ciertas realizaciones, la dosificación comprenderá administrar a un sujeto dosis que escalan de 1,0, 3,0 y 10 mg/kg de la formulación farmacéutica, es decir, una formulación que comprende h409A11, durante el transcurso del tratamiento. La formulación que comprende h409A11 puede ser una formulación líquida reconstituida, o puede ser una formulación líquida no previamente liofilizada. Los transcurros de tiempo pueden variar y pueden continuar siempre que se obtengan los efectos deseados. En ciertas realizaciones, la escala de dosis continuará hasta una dosis de aproximadamente 10 mg/kg. En ciertas realizaciones, el sujeto tendrá un diagnóstico histológico o citológico de melanoma u otra forma de tumor sólido y, en ciertos casos, un sujeto puede tener una enfermedad no medible. En ciertas realizaciones, el sujeto habrá sido tratado con otros productos quimioterapéuticos, mientras que en otras realizaciones, el sujeto será sin haber recibido tratamiento.

En realizaciones aún adicionales, el régimen de dosificación comprenderá administrar una dosis de 1, 3 o 10 mg/kg de cualquiera de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento (es decir, una formulación que comprende h409A11), a lo largo de todo el transcurso del tratamiento. Para dicho régimen de dosificación constante, el intervalo entre dosis será aproximadamente 14 días ($\pm$ 2 días). En ciertas realizaciones, el intervalo entre dosis será aproximadamente 21 días ($\pm$ 2 días).

En ciertas realizaciones, el régimen de dosificación comprenderá administrar una dosis de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, con escala de dosis intra-paciente. En ciertas realizaciones, se administrará una dosis de 5 mg/kg a 10 mg/kg a intervalos de cada 3 semanas o cada 2 semanas. En realizaciones aún adicionales, se administrará una dosis de 3 mg/kg a intervalos de tres semanas para pacientes de melanoma o pacientes con otros tumores sólidos. En estas realizaciones, los pacientes deben tener una enfermedad no resecable; sin embargo, los pacientes pueden haber tenido cirugía previa.

En ciertas realizaciones, a un sujeto se administrará una infusión IV de 30 minutos para el escalado de dosis, el intervalo de dosificación será de aproximadamente 28 días ($\pm$ 1 día) entre la primera y la segunda dosis. En ciertas realizaciones, el intervalo entre la segunda y la tercera dosis será de aproximadamente 14 días ($\pm$ 2 días). En ciertas realizaciones, el intervalo de dosificación será de aproximadamente 14 días ($\pm$ 2 días), para dosis posteriores a la segunda dosis.

En ciertas realizaciones, el uso de marcadores de la superficie celular y/o marcadores de citocinas, como se describe en las publicaciones de patente co-pendientes WO2012/018538 o WO2008/156712 se usarán en bioensayos para regímenes de monitorización, diagnósticos, de selección de pacientes y/o de tratamiento que impliquen el bloqueo de la ruta PD-1.

La administración subcutánea puede realizarse inyectando usando una jeringa, o usando otros dispositivos de inyección (por ejemplo el dispositivo Inject-ease®); bolígrafos inyectoros; o dispositivos sin agujas (por ejemplo, MediJector y BioJector®).

El amplio alcance de la presente invención se entiende mejor por referencia a los siguientes ejemplos, que no se destinan a limitar las invenciones a las realizaciones específicas. Las realizaciones específicas descritas en el presente documento se ofrecen a modo de ejemplo solamente y la invención ha de limitarse por los términos de las reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance completo de equivalentes a los que dichas reivindicaciones se titulan.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Producción de anticuerpos

h409A11 es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une a PD-1 humano y bloquea la interacción entre PD-1 y sus ligandos PDL1 y PDL2. El anticuerpo es un isotipo IgG4/kappa con una alteración de secuencia S228P estabilizante en la región Fc. La Tabla 2 proporciona una lista de las secuencias CDR. Los pesos moleculares teóricos de las cadenas pesadas y ligeras derivadas de las secuencias de aminoácidos, excluyendo glucosilación, son 49,3 kDa y 23,7 kDa, respectivamente. El anticuerpo parental (hPD-1.09A) se produjo inmunizando ratones con ADN hPD-1. El anticuerpo h409A11 se generó por humanización del anticuerpo anti-PD-1 humano murino parental por el Medical Research Council (Cambridge, RU) usando tecnología de injerto de CDR (por ejemplo, Patente de EE.UU. N.º 5.225.539), como se describe en el documento co-pendiente WO2008/156712.

Se construyó un plásmido de expresión para la expresión de cadenas pesadas y ligeras de h409A11. Las secuencias de nucleótido que codifican las cadenas pesadas y ligeras, junto con sus promotores y secuencia señal Poli A respectivos, se confirmaron por análisis de secuencia de ADN. El vector de expresión se usó posteriormente para transfectar una línea celular CHO. Se seleccionó un clon que expresaba el anticuerpo para la generación de un Banco de Semilla Maestro (MSB), basándose en el crecimiento, la productividad y la estabilidad de producción. Este MSB se usó después para preparar el anticuerpo y para generar el Banco Celular Maestro (MCB).

Las células del MCB se expandieron en matraces de agitación, bolsas de cultivo y un biorreactor de semilla para generar el inóculo para un biorreactor de producción para producir el producto de anticuerpo. El procesamiento adicional incluyó tres etapas de cromatografía (afinidad de proteína A, intercambio catiónico y cromatografía de intercambio aniónico), dos etapas de eliminación vírica ortogonal (inactivación vírica a bajo pH y filtración de reducción vírica), ultrafiltración/diafiltración y una etapa de filtración final a 0,2 µm.

Estructura y características de h409A11

h409A11 es un anticuerpo monoclonal humanizado altamente selectivo que bloquea la interacción entre PD-1 humano y sus ligandos PD-L1 y PD-L2. h409A11 está glucosilado heterogéneamente en la Asparagina 297 dentro del dominio Fc de cada cadena pesada, proporcionando pesos moleculares que varían normalmente en el intervalo entre 148,9 y 149,5 kDa, dependiendo de las cadenas de glucano unidas. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras de h409A11 se encuentran en SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 36. La cadena ligera sin las secuencias líder comprende los restos de aminoácidos 20 a 237 de SEQ ID NO: 36 y la cadena pesada sin las secuencias líder comprende los restos de aminoácidos 20 a 466 de SEQ ID NO: 31.

Formulaciones de PD-1 humanizado estables

En ciertas realizaciones, PD-1 humanizado estable, por ejemplo, h409A11, es una solución acuosa almacenada en condiciones refrigeradas (intervalo de temperatura: de forma típica aproximadamente 2-8 °C, pero en ciertas circunstancias, la formulación acuosa puede exhibir estabilidad a otras temperaturas incluyendo a aproximadamente 25 °C y aproximadamente 40 °C durante periodos de hasta aproximadamente 12 meses) a una concentración de $\geq$ 25 mg/ml en tampón histidina 10 mM, pH 5,0-6,0. En ciertas realizaciones, PD-1 humanizado estable, por ejemplo h409A11, es una solución acuosa a una concentración de aproximadamente 25 mg/ml en tampón histidina, pH 5,0-6,0. La formulación estable (es decir, la sustancia de fármaco) es normalmente una solución transparente a opalescente y puede contener particulados.

En ciertas realizaciones, una solución líquida o congelada de h409A11 se formula en tampón histidina (pH 5,5) que contiene sacarosa y polisorbato 80.

Una formulación a modo de ejemplo adicional incluye: h409A11 formulado en tampón histidina (pH 5,5) que contiene sacarosa y polisorbato 80 en forma liofilizada.

En ciertas realizaciones, la formulación PD-1 humanizado estable se proporciona como polvo liofilizado en viales destinados para un solo uso.

En ciertas realizaciones, la formulación PD-1 humanizado estable se reconstituye con agua para inyección (WFI) y se diluye asépticamente con volúmenes apropiados de cloruro sódico al 0,9% para inyección en un recipiente IV estéril para formar una solución de mezcla.

Actividad biológica

La actividad biológica del anticuerpo PD-1 humanizado se mide por su capacidad para competir con PD-L1 (ligando natural de PD-1) en la unión a PD-1 humano, cuantificada en ELISA competitivo con respecto a un material de referencia. Las formulaciones estables descritas en el presente documento exhiben actividad biológica durante largos periodos de tiempo, incluyendo hasta al menos aproximadamente dieciocho meses. La estabilidad de varios lotes de h409A11, en diversas condiciones de almacenamiento se ilustran en las Figuras 1-9.

Formulaciones estables de anticuerpos anti-PD-1 humanizados

Las formulaciones liofilizadas de anticuerpo anti-PD-1 se preparan como sigue. Una fórmula de lote a modo de ejemplo para el anticuerpo h409A11 se proporciona en la Tabla 3. La concentración final de anticuerpo es 25 mg/ml. Esta formulación de lote puede usarse para preparar las unidades liofilizadas de 50 mg/vial, como se analiza con referencia a la Tabla 4, a continuación. Se usa polisorbato 80 de una fuente vegetal. Pueden añadirse ácido clorhídrico o hidróxido sódico adicionales para ajustar el pH al valor deseado de aproximadamente 5,5 ($\pm$ 0,2). Los componentes se llevan a un volumen final de 14 l con agua estéril para inyección (WFI). Pueden prepararse lotes correspondientemente más pequeños por reducción proporcional de las cantidades listadas en la Tabla 3.

Una formulación de anticuerpo líquida a modo de ejemplo se prepara tomando la sustancia de fármaco (por ejemplo, anti-PD-1 humanizado a partir de una fórmula de lote descrita en el presente documento) que está en forma líquida (por ejemplo, h409A11 en una formulación acuosa) e intercambiando con tampón en el tampón deseado como la última etapa del proceso de purificación. En este caso, no hay etapa de liofilización previa. La sustancia de fármaco en el tampón histidina final se concentra a una concentración deseada. Los excipientes tales como sacarosa y polisorbato 80 se añaden a la sustancia de fármaco y se diluyen usando el tampón apropiado a la concentración de proteína final. La sustancia de fármaco formulada final se filtra usando filtros de 0,22 µm y se carga en un envase final (por ejemplo, viales de vidrio). Dicha formulación líquida se ejemplifica por una formulación líquida final que comprende histidina 10 mM pH 5,5, 7 % de sacarosa, 0,02 % de polisorbato 80 y 25 mg/ml de h409A11.

Tabla 3

Fórmula de lote de Solución de pre-liofilización de 14,0 l representativa para h409A11 Polvo para inyección, 50 mg/vial

Componente	Grado de compendio	Concentración (mg/ml)	Cantidad por lote (g)
Anticuerpo h409A11	N/A	25,0	350,0
L-Histidina	USP	1,55	21,7
Polisorbato 80	NF	0,2	2,8
Sacarosa	NF	70	980
Ácido clorhídrico ^a	NF	-	-
Hidróxido sódico ^a	NF	-	Ajuste de pH
Agua para inyección ^b	USP	-	14,0 l @ q.s

^a El ácido clorhídrico y el hidróxido sódico se añaden si se necesita ajustar el pH a 5,5
^b Agua retirada por sublimación y desorción durante la liofilización

La composición unitaria de una formulación liofilizada final a modo de ejemplo de anti-PD-1 humanizado se proporciona en la Tabla 4.

Tabla 4

Composición unitaria de formulación en polvo liofilizada para inyección, 50 mg/vial

Componente	Grado	Cantidad (mg/vial)	Concentración después de la reconstitución (mg/ml) ^b	Función
h409A11	N/A	50	25	Sustancia de fármaco/Principio activo farmacéutico
L-Histidina	USP	3,1	1,55	Tampón
Polisorbato 80	NF	0,4	0,2	Tensioactivo
Sacarosa	NF	140	70	Estabilizante/modificador de la tonicidad
Ácido clorhídrico ^c	NF			Ajuste de pH
Hidróxido sódico ^c	NF	"	"	Ajuste de pH
Agua estéril para inyección (sWFI o WFI) ^d	USP	2,0 ml @ q.s.	-	Disolvente

^a Se proporciona una carga en exceso de 0,4 ml para asegurar la recuperación de 50 mg de h409A11 por vial.
^b Después de la reconstitución con 2,3 ml de agua estéril para inyección.
^c El ácido clorhídrico y el hidróxido sódico se añaden si se necesita ajustar el pH a 5,5
^d Agua retirada por sublimación y desorción durante la liofilización

La formulación unitaria de la Tabla 4 comprende 1/20.000^{avo} de la formulación de lote de la Tabla 3 después de la liofilización para retirar el agua. Los 50 mg de DS se añaden como 2,0 ml de la formulación de lote de 25 mg/ml de la Tabla 3. Cada vial se carga con 2,4 ml y se reconstituye con 2,3 ml de sWFI, dando como resultado aproximadamente 2,4 ml de solución reconstituida debido al volumen de expansión de la torta liofilizada.

El fármaco se coloca en viales de tubos de vidrio estériles de boca de 20 mm, 6R DIN, Tipo 1, se cierran con tapones de caucho de butilo grises y se sellan con sellos de engarce de aluminio. Los viales se almacenan a 2 – 8 °C y se refrigeran cuando se transportan.

La formación de compuestos implica las siguientes etapas. Cargar la cantidad requerida de agua para inyección (WFI) en un recipiente de composición tarado. Cargar y disolver con mezcla, sacarosa, histidina y polisorbato 80 de una fuente vegetal. Medir el pH y ajustarlo si se necesita para llevar el pH a aproximadamente 5,4-5,6. Usar ácido clorhídrico y/o hidróxido sódico para ajustar el pH. Equilibrar la sustancia de fármaco a temperatura ambiente y cargar la sustancia de fármaco lentamente en el recipiente de composición. Continuar mezclando cuidadosamente para evitar la formación de espuma. Medir de nuevo el pH y ajustarlo si es necesario para llevar el pH a aproximadamente 5,5. Cargar el WFI al peso final de la solución a granel con mezcla cuidadosa continuada.

La filtración implica las siguientes etapas. Conectar un filtro de clarificación (0,22 µm) y un filtro de esterilización (0,22 µm) al recipiente de composición. Recoger una alícuota de la solución a granel para un ensayo de carga biológica después de la etapa de filtración de clarificación. Realizar la filtración aséptica usando un filtro de 0,22 µm en un envase estéril. Retirar la alícuota de la muestra después de la filtración aséptica para el ensayo de esterilidad en volumen. Realizar el ensayo de integridad después de la filtración del producto.

La carga implica las siguientes etapas. Usar equipo de carga adecuado, cargar asépticamente la solución del producto en viales de vidrio de tubos de Tipo I esterilizados para lograr un volumen de carga diana de 2,4 ml. Realizar comprobaciones de peso de carga durante la carga. Asentar parcialmente tapones de lio-forma esterilizados en viales cargados. Colocar los viales cargados en un secador por congelación.

La liofilización, la detención y el tapado implican las siguientes etapas. Liofilizar los viales usando un ciclo de liofilización apropiado. Después de que se complete la liofilización, volver a cargar los viales con nitrógeno filtrado en 0,22 µm y tapar completamente. Sacar los viales tapados del liofilizador y sellarlos.

Los viales resultantes se inspeccionan para defectos visuales y se almacenan a 2-8 °C. Los viales de dosificación unitaria terminados se transportan en condiciones refrigeradas.

Ejemplo 2

Ensayo de estabilidad de formulaciones liofilizadas de anticuerpos anti-PD-1 humanizados

Las Figuras 1-9 proporcionan datos de ensayos de estabilidad de formulaciones liofilizadas de un anticuerpo anti-PD-1 humano humanizado en diversas condiciones de almacenamiento. Los viales se almacenaron en configuraciones en vertical. Como se analiza con más detalle a continuación, las formulaciones de la presente invención muestran estabilidad a lo largo de al menos 24 meses para anticuerpos liofilizados a pH 5,5 (tampón histidina), así como formulaciones líquidas similares.

La estabilidad se logró como sigue. Las muestras se liofilizaron en viales de vidrio Tipo I 6R DIN y se sellaron con lio tapones de bromobutilo de 20 mm (Helvoet Rubber & Plastic Technologies BV, Hellevoetsluis, Países Bajos) y sellos de aluminio para voltear. Los viales se colocaron en estaciones de estabilidad en las siguientes condiciones de almacenamiento: 5 °C (5±3 °C), 25H (25 °C, 60 % de humedad relativa) o RH4 (40 °C, 70 % de humedad relativa). Las muestras se obtuvieron en un punto de tiempo inicial y para ciertas muestras a diversos puntos de tiempo incluyendo 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses.

La estabilidad de las muestras se ilustra por las diversas características presentadas en las tablas en las Figuras 1-9. Las muestras liofilizadas se inspeccionaron visualmente, se reconstituyeron y la formulación reconstituida se inspeccionó visualmente. El pH de las muestras después de la reconstitución se midió y la concentración de proteína se determinó por absorbancia UV. Las muestras se analizaron por la técnica CE-SDS en la que la proteína se desnaturizó con dodecil sulfato sódico (SDS) en condiciones reductoras y no reductoras y se separaron usando electroforesis capilar (CE). Las proteínas se separaron basándose en su peso molecular aparente. En condiciones no reductoras, todas las especies distintas del pico principal de IgG se clasifican como impurezas. En condiciones reductoras, la IgG se resuelve en las cadenas pesadas y ligeras. Todas las demás especies se clasifican como impurezas.

La pureza de la muestra se evaluó adicionalmente por cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC) en la que se determinó el porcentaje de monómero, así como los porcentajes de especies de alto peso molecular (posiblemente agregados) y los picos de elución tardía (posiblemente productos de degradación).

Los datos de caracterización de muestras adicionales se proporcionan en las Figuras 1-9. Se usó cromatografía de intercambio iónico de alto rendimiento (HP-IEX) para evaluar la pureza revelando la presencia de variantes ácidas o básicas. Los resultados se presentan como un porcentaje del material total observado. Las muestras se caracterizaron adicionalmente para la función biológica usando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para la unión a PD-1 humano. La concentración de anticuerpo necesaria para lograr la unión semi máxima se denomina CE₅₀. La potencia de la muestra de ensayo se evaluó comparando las curvas de unión de las muestras de ensayo con un material de referencia (o control) por la relación de CE₅₀. La potencia se expresó como potencia relativa en porcentaje del material de referencia (o control). El contenido de humedad del polvo liofilizado también se determinó por titulación colorimétrica. Se realizaron mediciones de recuento de materia particulada para contar las partículas ≥ 10 µm y ≥ 25 µm. El método usado para estas mediciones se basó en USP<788>.

Estos resultados demostraron alta estabilidad de las formulaciones de la presente invención durante al menos 24 meses a aproximadamente pH 5,5.

Ejemplo 3: resultados clínicos iniciales

Estudio de fase 1 de h409A11 (Anticuerpo monoclonal anti-PD-1) en pacientes con tumores sólidos avanzados

Una prueba de fase 1 examinó de forma segura PK, PD y la actividad antitumoral de h409A11. Se llevó a cabo un estudio de marca abierta de escalado de dosis en pacientes con neoplasia maligna refractaria a quimioterapia convencional. En el conjunto inicial de pacientes, los pacientes con tumores sólidos avanzados fueron tratados con una formulación de h409A11 estable como se describe en el presente documento. No hubo limitación/restricción con respecto a la cirugía; sin embargo, los pacientes no eran actualmente candidatos quirúrgicos. Se enrolaron cohortes de 3-6 pacientes (diseño 3+3) a dosis IV de 1, 3 o 10 mg/kg. Después de una dosis inicial y un ciclo 1 de 28 días, se permitió que los pacientes recibieran múltiples dosis dadas cada 2 semanas. Para la parte A de la fase 1, tres pacientes se trataron a 1 mg/kg, tres pacientes se trataron a 3 mg/kg y nueve pacientes se trataron a 10 mg/kg y todos se dosificaron cada 2 semanas. No hubo escala de dosis intrapaciente. Se realizó una evaluación radiográfica cada 8 semanas usando las directrices de RECIST 1.1.

Nueve pacientes, 3 a cada nivel de dosis, completaron el periodo (28 d) de toxicidad limitante por dosis (DLT). Los pacientes tenían cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC, n = 3), cáncer rectal (n = 2), melanoma (MEL, n = 2) o carcinoide (n = 1). Hasta la fecha, se administró un total de 63 dosis (mediana 7/paciente; máx. 12) sin DLT. Los eventos adversos (AE) relacionados con el fármaco a lo largo de todas las dosis incluyeron fatiga de grado 1 (n = 3), náuseas (n = 2), diarrea (n = 1), disgeusia (n = 1), dolor de pecho (n = 1) y purito (N = 1). Se informó un AE de grado 2 relacionado con fármaco de purito. Se informaron AE no relacionados con fármaco de grado 3. Los datos de PK se muestran en la Tabla 5. Basándose en RECIST, 2 paciente con MEL en terapia >6 meses tuvo una respuesta parcial y se observó evidencia preliminar de reducción del tamaño tumoral (enfermedad estable) en 3 pacientes adicionales con cáncer avanzado. Estos resultados muestran que h409A11 se toleró bien con DLT a lo largo de 3 niveles de dosis ensayados (es decir, 1, 3 y 5 mg/kg). Se observó evidencia de actividad antitumoral.

Tabla 5. Valores de parámetro PK medios (CV %) de MK-3475 después de la dosis IV única de 1, 3 o 10 mg/kg en el ciclo 1

Dosis (mg/kg)	N	C _{máx} (µg/ml)	AUC _(0-28días) (µg-día/ml)	T _{1/2} ^a (día)
1	4	16,8 (23)	163 (20) ^b	15,1 (41) ^b
3	3	109 (26)	990 (23)	21,7(11)
10	2	337 (8)	2640 (30)	13,6(28)

^a Muestreo de PK hasta 28 días después de la primera administración IV, por lo tanto t_{1/2} no caracterizado completamente.
^bN=3 debido a discontinuación del sujeto

La tabla 6 proporciona una breve descripción de las secuencias en el listado de secuencias.

Identificadores de secuencia	
SEQ ID NO:	Descripción
1	región variable de cadena pesada hPD-1.08A (ADN)
2	región variable de cadena ligera hPD-1.08A (ADN)
3	región variable de cadena pesada hPD-1.09A (ADN)
4	región variable de cadena ligera hPD-1.09A (ADN)
5	región variable de cadena pesada hPD-1.08A (AA)
6	región variable de cadena ligera hPD-1.08A (AA)
7	región variable de cadena pesada hPD-1.09A (AA)
8	región variable de cadena ligera hPD-1.09A (AA)
9	CDR1 de cadena ligera hPD-1.08A (AA)
10	CDR2 de cadena ligera hPD-1.08A (AA)
11	CDR3 de cadena ligera hPD-1.08A (AA)
12	CDR1 de cadena pesada hPD-1.08A (AA)
13	CDR2 de cadena pesada hPD-1.08A (AA)
14	CDR3 de cadena pesada hPD-1.08A (AA)
15	CDR1 de cadena ligera hPD-1.09A (AA)
16	CDR2 de cadena ligera hPD-1.09A (AA)
17	CDR3 de cadena ligera hPD-1.09A (AA)
18	CDR1 de cadena pesada hPD-1.09A (AA)
19	CDR2 de cadena pesada hPD-1.09A (AA)
20	CDR3 de cadena pesada hPD-1.09A (AA)
21	región variable de cadena pesada 109A-H (ADN)
22	región variable de cadena pesada con codón optimizado 109A-H (ADN)

23	cadena pesada de longitud completa con codón optimizado 409A-H (ADN)
24	región variable de cadena ligera K09A-L-11 (ADN)
25	región variable de cadena ligera K09A-L-16 (ADN)
26	región variable de cadena ligera K09A-L-17 (ADN)
27	región variable de cadena ligera con codón optimizado K09A-L-11 (ADN)
28	región variable de cadena ligera con codón optimizado K09A-L-16 (ADN)
29	región variable de cadena ligera con codón optimizado K09A-L-17 (ADN)
30	región variable de cadena pesada 109A-H (AA)
31	cadena pesada de longitud completa 409A-H (AA)
32	región variable de cadena ligera K09A-L-11 (AA)
33	región variable de cadena ligera K09A-L-16 (AA)
34	región variable de cadena ligera K09A-L-17 (AA)
35	cadena pesada de longitud completa 109A-H (AA)
36	cadena ligera de longitud completa K09A-L-11 (AA)
37	cadena ligera de longitud completa K09A-L-16 (AA)
38	cadena ligera de longitud completa K09A-L-17 (AA)

Como se usa en el presente documento, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de palabras tales como “un”, “una” y “el/la” incluyen sus referencias plurales correspondientes salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Salvo que se indique lo contrario, las proteínas y los sujetos a los que se hace referencia en el presente documento son proteínas y sujetos humanos, en lugar de otras especies.

REFERENCIAS

1. Sharpe, A.H, Wherry, E.J., Ahmed R., y Freeman G.J. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature Immunology* (2007); 5 8:239-245.
2. Greenwald R.J., Freeman G.J., y Sharpe A.H. The B7 family revisited. *Annual Reviews of Immunology* (2005); 23:515-548.
3. Okazaki T y Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *International immunology* (2007);19:813-824.
4. Chemnitz *et al.* SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents activation. *J. Immunol.* (2004); 173: 945-954.
5. Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H. *et al.* Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the *PD-1* gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* (1999); 11:141-151.
6. Okazaki T *et al.* Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1 deficient mice. *Nature Medicine* (2003); 9: 1477-1483.
7. Ansari MJ. The programmed death-1 pathway regulates diabetes in nonobese diabetic (NOD) 25 mice. *JExp. Med.* (2003), Jul 7;198(1):63-9.
8. Riley J y June C. The road to recovery: translating PD-1 biology into clinical benefit. *Trends in Immunology* (2006); 28:48-50.
9. Barber DL. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* (2006);439: 682-687.
10. Trautmann L *et al.* Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature Medicine* (2006) 12: 1198-1202.
11. Petrovas C *et al.* PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *JExp. Med.* (2006); 203: 2281-2292.
12. Day CL *et al.* PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression, *Nature*. 21 Sep 2006;443(7109):350-4.
13. Velu V *et al.* 2009. Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature* (2009) 458: 206-210.
14. Finnefrock *et al.* PD-1 blockade in rhesus macaques: impact on chronic infection and prophylactic vaccination. *J. of Immunol.* (2009); 182: 980-987.

15. Dong H *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.* Ag 2002;8(8):793-800.

16. Yang *et al.* PD-1 interaction contributes to the functional suppression of T-cell responses to human uveal melanoma cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Jun 2008;49(6) (2008): 49: 2518-2525.

17. Ghebeh *et al.* The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia* (2006) 8: 190-198.

18. Hamanishi J *et al.* Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proceeding of the National Academy of Sciences* (2007): 104: 3360-3365.

19. Thompson RH *et al.* Significance of B7-H1 overexpression in kidney cancer. *Clinical genitourin Cancer* (2006): 5: 206-211.

20. Nomi, T. Sho, M., Akahori, T., *et al.* Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death- 1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research* (2007); 13:2151-2157.

21. Ohigashi Y *et al.* Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand 2 expression in human esophageal cancer. *Clin. Cancer Research* (2005): 11: 2947-2953.

22. Inman *et al.* PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG- induced granulomata: associations with localized stage progression. *Cancer* (2007): 109: 1499- 1505.

23. Shimauchi T *et al.* Augmented expression of programmed death-1 in both neoplastic and nonneoplastic CD4+ T-cells in adult T-cell Leukemia/ Lymphoma. *Int. J. Cancer* (2007): 121:2585-2590.

24. Gao *et al.* Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research* (2009) 15: 971-979.

25. Nakanishi J. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother.* (2007) 56: 1173- 1182.

26. Hino *et al.* Tumor cell expression of programmed cell death-1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer* (2010): 00: 1-9.

La citación de las referencias en el presente documento no se pretende como una admisión de que la referencia es técnica anterior pertinente, ni constituye ninguna admisión conforme a los contenidos o la fecha de estas publicaciones o documentos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Merck Sharp & Dohme Corp.
Sharma, Manoj K.
Narasimhan, Chakravarthy Nachu
Gergich, Kevin
Kang, Soonmo Peter

<120> Formulaciones estables de anticuerpos para el receptor PD-1 de muerte programada y tratamientos relacionados

<130> 23060 PCT

<150> 61/470,121

<151> 31-03-2011

<160> 38

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 435

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> región variable de cadena pesada hPD-1.08A

<400> 1

```

atgrgatgga gctgtatcat kctctttttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactcccag      60
gtccaactgc agcagcctgg ggctgaactg gtgaagcctg gggcttcagt gaagttgtcc      120
tgcaaggcct ctggctacac cttcaccagt tattatctgt actggatgaa acagaggcct      180
ggacaaggcc ttgagtggat tggggggggt aatcctagta atggtggtac taacttcagt      240
gagaagttca agagcaaggc cacactgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg      300
caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtacaag aagggattct      360
aactacgacg ggggctttga ctactggggc caaggcacta ctctcacagt ctctcagcc      420
aaaacgacac cccca                                     435

```

10 <210> 2
<211> 453
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> región variable de cadena ligera hPD-1.08A

<400> 2

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt      60
gacattgtgc tgacacagtc tcctacttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc      120
atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct ttagttatth gcactggtac      180
caacagaaac caggacagcc acccaaaactc ctcatctttc ttgcatccaa cctagagtct      240
ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat      300
cctgtggagg aggaggacgc tgcaacctat tattgtcagc acagttggga gcttccgctc      360
acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc      420
atcttcccac catccagtaa gcttgggaag ggc                                     453

```

25 <210> 3
<211> 464
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> región variable de cadena pesada hPD-1.09A

<400> 3

ES 2 676 205 T3

```

atgraatgca gctgggttat yctctttttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactcccag      60
gtccaactgc agcagcctgg ggctgaactg gtgaagcctg ggacttcagt gaagttgtcc      120
tgcaaggctt ctggctacac cttcaccaac tactatatgt actgggtgaa gcagaggcct      180
ggacaaggcc ttgagtggat tggggggatt aatcctagca atggtggtac taacttcaat      240
gagaagttca agaacaaggc cactactgact gtagacagtt cctocagcac aacctacatg      300
caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtacaag aagggtattat      360
aggttcgaca tgggctttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctcagcc      420
aaaacgacac ccccatcgt ytatcccbtg gccctggaa gctt                        464

```

<210> 4
 <211> 438
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región variable de cadena ligera hPD-1.09A
 <400> 4

```

atggagwcag acacactset gytatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggc      60
gacattgtgc tgacacagtc tcctgcttcc ttagctgtat ctctgggaca gagggccgcc      120
atctcatgca gggccagcaa aggtgtcagt acatctgget atagttattt gcactggtac      180
caacagaaac caggacagtc acccaaactc ctcatctatc ttgcatccta cctagaatct      240
gggggtccctg ccaggttcag tggcagtggt tctgggacag acttcaccct caacatccat      300
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga ccttccgctc      360
acgttcggta ctgggaccaa gctggagctg aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc      420
atcttcccac catccagt                        438

```

<210> 5
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región variable de cadena pesada hPD-1.08A
 <400> 5

ES 2 676 205 T3

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Leu Tyr Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Val Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Ser Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Arg Asp Ser Asn Tyr Asp Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys
115 120

<210> 6
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> región variable de cadena ligera hPD-1.08A
<400> 6

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Phe Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

ES 2 676 205 T3

Lys Leu Leu Ile Phe Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 7

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región variable de cadena pesada hPD-1.09A

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
1 5 10 15

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

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

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Ser Ser Ser Ser Thr Thr Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys
115 120

<210> 8

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 676 205 T3

<220>

<223> región variable de cadena ligera hPD-1.09A

5 <400> 8

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Ala Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 9

10 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> CDR1 cadena ligera hPD-1.08A

<400> 9

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Phe Ser Tyr Leu His
1 5 10 15

20 <210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> CDR2 cadena ligera hPD-1.08A

<400> 10

30

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 11

35 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR3 cadena ligera hPD-1-08A

5

<400> 11

Gln His Ser Trp Glu Leu Pro Leu Thr
1 5

10

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> CDR1 cadena pesada hPD-1.08A

<400> 12

Ser Tyr Tyr Leu Tyr
1 5

20

<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> CDR2 cadena pesada hPD-1.08A

30

<400> 13

Gly Val Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Ser Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

35

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> CDR3 cadena pesada hPD-1.08A

<400> 14

Arg Asp Ser Asn Tyr Asp Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

45

<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> CDR1 cadena ligera hPD-1.09A

<400> 15

55

ES 2 676 205 T3

Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR2 cadena ligera hPD-1.09A
<400> 16

Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR3 cadena ligera hPD-1.09A
<400> 17

Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR1 cadena pesada hPD-1.09A

<400> 18

Asn Tyr Tyr Met Tyr
1 5

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR2 cadena pesada hPD-1.09A

<400> 19

Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asn

<210> 20

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> CDR3 cadena pesada hPD-1.09A
 <400> 20

Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

10

<210> 21
 <211> 417
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> región variable de cadena pesada 109A-H

20

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(57)

25

atggactgga cctggagcat ccttttcttg gtggcagcac caacaggagc ccaactccaa 60
 gtgcagctgg tgcagtctgg agttgaagtg aagaagcccg gggcctcagt gaaggtctcc 120
 tgcaaggctt ctggctacac ctttaccaac tactatatgt actgggtgcg acaggcccct 180
 ggacaagggc ttgagtggat gggagggatt aatcctagca atggtgtgtac taacttcaat 240
 gagaagttca agaacagagt caccttgacc acagactcat ccacgaccac agcctacatg 300
 gaactgaaga gcctgcaatt tgacgacacg gccgtttatt actgtgcgag aagggattat 360
 aggttcgaca tgggctttga ctactggggc caagggacca cggtcaccgt ctcgagc 417

30

<210> 22
 <211> 417
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región variable de cadena pesada con codón optimizado 109A-H

35

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(57)

40

<400> 22

```

atggactgga cctggtctat cctgttcctg gtggccgctc ctaccggcgc tcaactcccag      60
gtgcagctgg tgcagtcogg cgtggagggtg aagaagcctg gcgcctccgt caagggtgtcc      120
tgcaaggcct ccggctacac cttcaccaac tactacatgt actgggtgcg gcaggctccc      180
ggccagggac tggagtggat gggcggcatc aacccttcca acggcggcac caacttcaac      240
gagaagttca agaaccgggt gaccctgacc accgactcct ccaccaccac cgcctacatg      300
gagctgaagt ccctgcagtt cgacgacacc gcogtgtact actgcgccag gcgggactac      360
cggttcgaca tgggcttcga ctactggggc cagggcacca ccgtgaccgt gtcctcc      417

```

<210> 23
 <211> 1398
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cadena pesada de longitud completa con codón optimizado 409A-H

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(57)

<400> 23

atggcogtgc tgggcoctgct gttctgcctg gtgaccttcc cttoctgogt gctgtcccag	60
gtgcagctgg tgcagtcogg cgtggaggtg aagaagcctg gcgcctccgt caaggtgtcc	120
tgtaaggcct ccggctacac cttaccaaac tactacatgt actgggtgcg gcaggcccca	180
ggccaggggac tggagtggat gggcgggcatc aacccttcca acggcggcac caacttcaac	240
gagaagttca agaaccgggt gaccctgacc acogactcct ccaccacaac cgcctacatg	300
gaactgaagt ccctgcagtt cgacgacacc gcogtgtact actgcgccag gcgggactac	360
cggttogaca tgggcttcga ctactggggc cagggcacca cogtgaccgt gtctccgct	420
agcaccaagg gcccttccgt gttccctctg gccccttgct cccggteccac ctccgagtcc	480
accgcogctc tgggctgtct ggtgaaggac tacttccctg agcctgtgac cgtgagctgg	540
aactctggcg ccctgacctc cggcgtgcac accttccctg ccgtgctgca gtctccggc	600
ctgtactccc tgtctccgt ggtgaccgtg ccttctcct cctggggcac caagacctac	660
acctgcaacg tggaccacaa gccttccaac accaaggtgg acaagcgggt ggagtccaag	720
tacggccctc cttgccctcc ctgccctgcc cctgagttcc tgggcggacc ctccgtgttc	780
ctgttccctc ctaagcctaa ggacacctg atgatctccc ggacccctga ggtgacctgc	840
gtggtggtgg acgtgtccca ggaagatcct gaggtccagt tcaattggta cgtggatggc	900
gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagcct cgggaggaac agttcaactc cacctaccgg	960
gtggtgtctg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga atacaagtgc	1020
aaggtcagca acaagggcct gccctcctcc atcgagaaaa ccatctocaa ggccaagggc	1080
cagcctcgcg agcctcaggt gtacacctg cctcctagcc aggaagagat gaccaagaat	1140
caggtgtccc tgacatgcct ggtgaagggc ttctaccctt ccgatatcgc cgtggagtgg	1200
gagagcaacg gccagccaga gaacaactac aagaccacc ctcctgtgct ggactccgac	1260
ggctccttct tcctgtactc caggctgacc gtggacaagt cccggtggca ggaaggcaac	1320
gtcttttctc gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtccttg	1380
tccctgtctc tgggcaag	1398

<210> 24
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región variable de cadena ligera K09A-L-11

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(60)

<400> 24

ES 2 676 205 T3

```

atggaagccc cagctcagct tctcttctct ctgctactct ggctcccaga taccacogga      60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      120
ctctcctgca gggccagcaa aggtgtcagt acatctggct atagttatth gcactgggtat      180
caacagaaac ctggccaggc tcccaggctc ctcatctatc ttgcatccta cctagaatct      240
ggcgtcccag ccaggttcag tggtagtggg tctgggacag acttcactct caccatcagc      300
agcctagagc ctgaagatth tgcagthtat tactgtcagc acagcaggga ccttccgctc      360
acgttcggcg gagggaccaa agtggagatc aaa                                     393

```

<210> 25
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región variable de cadena ligera K09A-L-16

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(60)

<400> 25

```

atggaaaacc cagcgcagct tctcttctct ctgctactct ggctcccaga taccacogga      60
gaaattgtgc tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc      120
atctcctgca gggccagcaa aggtgtcagt acatctggct atagttatth gcattgggtac      180
ctccagaagc cagggcagtc tccacagctc ctgatctatc ttgcatccta cctagaatct      240
ggggctccctg acaggttcag tggcagtggg tcaggcacag atthttacact gaaaatcagc      300
agagtggagg ctgaggatgt tggggthtat tactgccagc atagtaggga ccttccgctc      360
acgtthtggcc aggggaccaa gctggagatc aaa                                     393

```

<210> 26
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región variable de cadena ligera K09A-L-17

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(60)

<400> 26

ES 2 676 205 T3

```

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct gggctctctgg atccagtggg      60
gatattgtga tgacctcagac tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc      120
atctcctgca gggccagcaa aggtgtcagt acatctggct atagttattt gcattggtat      180
ctgcagaagc cagggcagtc tccacagctc ctgatctatc ttgcatccta cctagaatct      240
ggagtcccag acaggttcag tggcagtggg tcaggcactg ctttcacact gaaaatcagc      300
aggggtggagg ctgaggatgt tggactttat tactgccagc atagtaggga ccttcogctc      360
acgtttggcc aggggaccaa gctggagatc aaa                                     393

```

5
 <210> 27
 <211> 390
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> región variable de cadena ligera con codón optimizado K09A-L-11
 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(57)

15
 <400> 27

```

atggccccctg tgcagctgct gggcctgctg gtgctgttcc tgccctgccat gcgggtgcgag      60
atcgtgctga cccagtcccc tgccaccctg tccctgagcc ctggcgagcg ggctaccctg      120
agctgcagag cctccaaggg cgtgtccacc tccggtact cctacctgca ctggtatcag      180
cagaagccag gccaggcccc tcggctgctg atctacctgg cctcctacct ggagtccggc      240
gtgcctgccc ggttctccgg ctccggaagc ggcaccgact tcacctgac catctcctcc      300
ctggagcctg aggacttcgc cgtgtactac tgccagcact cccgggacct gcctctgacc      360
tttggcggcg gaacaaagggt ggagatcaag                                     390

```

20
 <210> 28
 <211> 390
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> región variable de cadena ligera con codón optimizado K09A-L-16
 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(57)

30
 <400> 28

ES 2 676 205 T3

```

atggcccctg tgcagctgct gggcctgctg gtgctgttcc tgcctgccat gcggtgagag      60
atcgtgctga cccagtcctc tctgtccctg cctgtgaccc ctggcgagcc tgcctccatc      120
tcctgccggg cctccaaggg cgtgtccacc tccggtact cctacctgca ctggtatctg      180
cagaagcctg gccagtcctc ccagctgctg atctacctgg cctcctacct ggagtccggc      240
gtgcctgacc ggttctccgg ctccggcagc ggcaccgact tcacctgaa gatctccgg      300
gtggaggccg aggacgtggg cgtgtactac tgcagcact cccgggacct gcctctgacc      360
ttcggccagg gcaccaagct ggagatcaag      390

```

5
 <210> 29
 <211> 390
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> región variable de cadena ligera con codón optimizado K09A-L-17
 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(57)

15
 <400> 29

```

atggcccctg tgcagctgct gggcctgctg gtgctgttcc tgcctgccat gcggtgagac      60
atcgtgatga cccagacccc tctgtccctg cctgtgaccc ctggcgagcc tgcctccatc      120
tcctgccggg cctccaaggg cgtgtccacc tccggtact cctacctgca ctggtatctg      180
cagaagcctg gccagtcctc tcagctgctg atctacctgg cctcctacct ggagtccggc      240
gtgcctgacc ggttctccgg ctccggaagc ggcaccgctt ttacctgaa gatctccaga      300
gtggaggccg aggacgtggg cctgtactac tgcagcact cccgggacct gcctctgacc      360
ttcggccagg gcaccaagct ggagatcaag      390

```

20
 <210> 30
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> región variable de cadena pesada 109A-H

30
 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(19)
 <400> 30

ES 2 676 205 T3

```

Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Pro Thr Gly
1           5           10           15

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys
          20           25           30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
          35           40           45

Thr Asn Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
          50           55           60

Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn
65           70           75           80

Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr
          85           90           95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val
          100          105          110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr
          115          120          125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          130          135

```

<210> 31
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cadena pesada de longitud completa 409A-H

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(19)

<400> 31

ES 2 676 205 T3

Met	Ala	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Phe	Cys	Leu	Val	Thr	Phe	Pro	Ser	Cys	1	5	10	15
Val	Leu	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Val	Glu	Val	Lys	Lys	20	25	30	
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	35	40	45	
Thr	Asn	Tyr	Tyr	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	50	55	60	
Glu	Trp	Met	Gly	Gly	Ile	Asn	Pro	Ser	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Phe	Asn	65	70	75	80
Glu	Lys	Phe	Lys	Asn	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Ser	Ser	Thr	Thr	85	90	95	
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Lys	Ser	Leu	Gln	Phe	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	100	105	110	
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Arg	Asp	Tyr	Arg	Phe	Asp	Met	Gly	Phe	Asp	Tyr	115	120	125	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	130	135	140	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	145	150	155	160
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	165	170	175	
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	180	185	190	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	195	200	205	
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	210	215	220	
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	225	230	235	240

ES 2 676 205 T3

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
 245 250 255
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 275 280 285
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 340 345 350
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365
 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 420 425 430
 Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 450 455 460
 Gly Lys
 465

<210> 32
 <211> 130

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región variable de cadena ligera K09A-L-11

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(19)

<400> 32

```

Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala
1          5          10          15

Met Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu
          20          25          30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val
          35          40          45

Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50          55          60

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly
65          70          75          80

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
          85          90          95

Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
          100          105          110

His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
          115          120          125

Ile Lys
          130

```

<210> 33
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región variable de cadena ligera K09A-L-16

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(19)

<400> 33

ES 2 676 205 T3

Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala
1 5 10 15

Met Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val
35 40 45

Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
50 55 60

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly
65 70 75 80

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln
100 105 110

His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125

Ile Lys
130

<210> 34
<211> 130
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> región variable de cadena ligera K09A-L-17

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(19)

<400> 34

Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala
1 5 10 15

Met Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val
35 40 45

ES 2 676 205 T3

Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
50 55 60

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly
65 70 75 80

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu
85 90 95

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln
100 105 110

His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125

Ile Lys
130

<210> 35
<211> 469
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada de longitud completa 109A-H

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(19)

<400> 35

Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr
85 90 95

Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Lys	Ser	Leu	Gln	Phe	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	100	105	110	
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Arg	Asp	Tyr	Arg	Phe	Asp	Met	Gly	Phe	Asp	Tyr	115	120	125	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	130	135	140	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	145	150	155	160
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	165	170	175	
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	180	185	190	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	195	200	205	
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	210	215	220	
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	225	230	235	240
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	245	250	255	
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	260	265	270	
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	275	280	285	
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	290	295	300	
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	305	310	315	320
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	325	330	335	
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	340	345	350	

ES 2 676 205 T3

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
465

5 <210> 36
<211> 237
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cadena ligera de longitud completa K09A-L-11

15 <220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(19)

<400> 36

Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala
1 5 10 15

Met Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val
35 40 45

Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50 55 60

ES 2 676 205 T3

Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ser	Gly	65	70	75	80
Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	85	90	95	
Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	100	105	110	
His	Ser	Arg	Asp	Leu	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	115	120	125	
Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	130	135	140	
Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	145	150	155	160
Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	165	170	175	
Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	180	185	190	
Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	195	200	205	
Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	210	215	220	
Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys				225	230	235	

<210> 37

<211> 237

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera de longitud completa K09A-L-16

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(19)

<400> 37

Met	Ala	Pro	Val	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Val	Leu	Phe	Leu	Pro	Ala	1	5	10	15
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---	----	----

ES 2 676 205 T3

Met	Arg	Cys	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	20	25	30
Thr	Pro	Gly	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Gly	Val	35	40	45
Ser	Thr	Ser	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	50	55	60
Gln	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ser	Gly	65	70	75
Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	85	90	95
Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	100	105	110
His	Ser	Arg	Asp	Leu	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	115	120	125
Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	130	135	140
Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	145	150	155
Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	165	170	175
Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	180	185	190
Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	195	200	205
Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	210	215	220
Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys				225	230	235

<210> 38

<211> 237

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera de longitud completa K09A-L-17

5

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(19)

<400> 38

ES 2 676 205 T3

Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala
1 5 10 15

Met Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val
35 40 45

Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
50 55 60

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly
65 70 75 80

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu
85 90 95

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln
100 105 110

His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
130 135 140

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
145 150 155 160

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
165 170 175

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
180 185 190

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
195 200 205

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu

210

215

220

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

REIVINDICACIONES

1. Una formulación liofilizada estable de un anticuerpo anti-PD-1 humano, producido liofilizando una solución acuosa que comprende:

- a) 25-100 mg/ml del anticuerpo anti-PD-1 humano;
- b) 70 mg/ml de sacarosa;
- c) 0,2 mg/ml de polisorbato 80; y
- d) tampón Histidina 10 mM a pH 5,0 - pH 6,0 y

en la que el anticuerpo, comprende:

una cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 20 a 237 de SEQ ID NO: 36 y una cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 466 de SEQ ID NO: 31.

2. Una formulación farmacéutica líquida estable de un anticuerpo anti-PD-1 humano, que comprende:

- a) 25-100 mg/ml del anticuerpo anti-PD-1 humano;
- b) 70 mg/ml de sacarosa;
- c) 0,2 mg/ml de polisorbato 80; y
- d) tampón Histidina 10 mM a pH 5,0 - pH 6,0,

en la que el anticuerpo, comprende:

una cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 20 a 237 de SEQ ID NO: 36 y una cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 466 de SEQ ID NO: 31.

3. La formulación de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el anticuerpo anti-PD-1 humano está presente a 25 mg/ml en la solución acuosa.

4. La formulación de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en la que la solución acuosa tiene un pH de 5,5.

5. La formulación de cualquier reivindicación anterior, en la que el anticuerpo es h409A11.

6. La formulación farmacéutica liofilizada estable de la reivindicación 1, en la que la solución acuosa comprende 25,0 mg/ml del anticuerpo anti-PD-1 humano, 1,55 mg/ml de histidina, 0,2 mg/ml de polisorbato 80, 70 mg/ml de sacarosa y tiene un pH de 5,5; en la que el anticuerpo anti-PD-1 humano es h409A11.

7. Una formulación farmacéutica líquida de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, para su uso en un método de tratamiento por terapia.

8. La formulación farmacéutica líquida para su uso de la reivindicación 7 en donde la terapia es el tratamiento de cáncer.

9. La formulación farmacéutica líquida para su uso de la reivindicación 8, en donde se administra una dosis seleccionada de 1,0, 3,0 y 10 mg/kg a intervalos de 14 días o 21 días a lo largo de todo el transcurso del tratamiento.

10. La formulación farmacéutica líquida para su uso de la reivindicación 8, en la que el anticuerpo anti-PD-1 humano, o un fragmento de unión a antígeno del mismo se administran en una dosis de 5,0 mg/kg o 10 mg/kg administrada a intervalos de cada 2 semanas o de cada 3 semanas a lo largo de todo el transcurso del tratamiento.

11. La formulación farmacéutica líquida para su uso de la reivindicación 8, en donde la terapia es el tratamiento de melanoma, en donde el anticuerpo anti-PD-1 humano, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se administran en una dosis de 3,0 mg/kg administrada a intervalos de cada 3 semanas a lo largo de todo el transcurso del tratamiento.

12. La formulación farmacéutica líquida para su uso de la reivindicación 8, que se administra en una infusión IV de 30 minutos.

13. La formulación farmacéutica líquida para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8-12, en donde el tratamiento es de un sujeto sin tratamiento previo.

14. La formulación farmacéutica líquida para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8-12, en donde el tratamiento es de un sujeto que ha sido previamente tratado con productos quimioterapéuticos adicionales.

Datos de estabilidad para h409A11 Anti-PD-1 Polvo para inyección, 50 mg/vial											
5 °C											
1											
Intervalo de ensayo de estabilidad											
Ensayo	Aceptación de criterios clínicos	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses		
Condición de almacenamiento											
Número de lote											
Descripción Polvo liofilizado	Polvo blanco a blanquecino	Torta blanca	Torta blanca	Torta blanca	Torta blanca	Torta blanca	Torta blanca	Torta blanca	Torta blanca		
Tiempo de reconstitución (segundos)	Resultados indicados	39	36	35	42	43	34	28	45		
Descripción Solución reconstituida											
Claridad	Solución transparente a opalescente: puede contener particulados	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente		
Color	Resultados indicados por la solución de referencia "Y"	Incoloro#	Incoloro#	Incoloro#	Incoloro#	Incoloro#	Incoloro#	Incoloro#	Incoloro#		
pH	5,0 – 6,0	5,6	5,5	5,5	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6		
Ensayo UV A₂₈₀ nm	21,3 – 28,8 mg/ml	24,9	24,8	24,1	24,8	24,4	25,5	24,6	23,6		
Potencia biológica ELISA competitivo anti-PD-1 (% relativo al control)	50-150 % de la referencia	95	80	86	116	93	87	76	83		
Pureza											
HPSEC											
Especie de alto peso molecular (%)	≤ 5,00	ND	ND	<QL	<QL	<QL	<QL	<QL	<QL		
Picos de elución tardía (%)	Resultados informados	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
Monómero (%)	≥ 90,0	100,0	100,0	99,8	99,8	99,8	99,8	100,0	99,8		
CE-SDS reductor											
% de impurezas	≤ 10,00 % especies distintas de cadenas pesadas y ligeras	0,38	0,35	0,39	0,41	0,40	0,44	0,38	0,39		

FIG.1A

Datos de estabilidad para h409A11 Anti-PD-1 Polvo para inyección, 50 mg/vial												
Condición de almacenamiento		5 °C										
Número de lote		1										
		Intervalo de ensayo de estabilidad										
Ensayo	Aceptación de criterios clínicos	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses			
CE-SDS no reductor												
% de impureza	≤ 10,00 % especies distintas de la banda principal	0,59	0,57	0,53	0,56	1,12	0,94	0,70	1,22			
HP-IEX												
Variantes ácidas (%)	Resultados informados	2,5	2,5	3,3	3,2	3,3	3,4	3,2	3,3			
Ácido 1 (%)	Resultados informados	3,7	3,7	3,6	3,9	3,9	3,9	3,7	3,8			
Ácido 2 (%)	Resultados informados	8,2	8,5	7,7	8,0	8,1	8,3	7,8	8,0			
Principal (%)	Resultados informados	50,8	54,0	49,6	47,7	47,1	48,1	45,6	47,3			
Básico 1 (%)	Resultados informados	11,0	10,6	10,7	11,3	11,7	10,4	11,50	11,0			
Básico 2 (%)	Resultados informados	8,9	8,4	8,9	8,9	9,3	9,0	9,7	8,6			
Variantes básicas (%)	Resultados informados	14,9	12,4	16,1	17,0	16,5	16,8	18,5	17,9			
Humedad (%)	≤ 5,0 %	0,3	0,4	0,3	0,5	0,4	0,4	0,7	0,6			
Materia particulada (HIAC*)	Cumple USP <788>											
≥ 10 µm por recipiente	NMT 6000	51	50	51	50	51	57	43	44			
≥ 25 µm por recipiente	NMT 600	2	3	2	0	4	1	1	0			
Endotoxina bacteriana	≤ 0,25 EU/mg	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT			
Esterilidad	Cumple los requisitos del ensayo de esterilidad	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT			
Integridad del cierre del envase	No se detecta fuga	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT			

Límite de cuantificación (QL) = 0,25 %, Límite de Detección (DL) = 0,10 %, NT = no ensayado, ND = no detectado

* no ensayado de acuerdo con la solución de referencia "Y"

* Se usó una versión modificada de USP<788> para el lote 1 pre-clínico

FIG.1B

Datos de estabilidad para h409A11 Anti-PD-1 Polvo para inyección, 50 mg/vial									
Condición de almacenamiento									
25H (25 °C, 60 % HR)									
Número de lote									
1									
Intervalo de ensayo de estabilidad									
Ensayo	Aceptación de criterios clínicos	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses	12 meses			
Descripción Polvo liofilizado	Polvo blanco a blanquecino	Torta blanca	Torta blanca	Torta blanca	Torta blanca	Torta blanca			
Tiempo de reconstitución (segundos)	Resultados indicados	39	36	35	42	34			
Descripción Solución reconstituida									
Claridad	Solución transparente a opalescente: puede contener particulados	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente			
Color	Resultados indicados por la solución de referencia "Y"	Incoloro#	Incoloro#	Incoloro#	Incoloro#	Incoloro#			
pH	5,0 – 6,0	5,6	5,6	5,5	5,6	5,6			
Ensayo UV A₂₈₀ nm	21,3 – 28,8 mg/ml	24,9	25,1	23,5	24,2	24,8			
Potencia biológica ELISA competitivo anti-PD-1 (% relativo al control)	50-150 % de la referencia	95	80	81	105	96			
Pureza									
HPSEC									
Especie de alto peso molecular (%)	≤ 5,00	ND	ND	<QL	<QL	<QL			
Picos de elución tardía (%)	Resultados informados	ND	ND	ND	ND	ND			
Monómero (%)	≥ 90,0	100,0	100,0	99,8	99,8	99,8			
CE-SDS reductor									
% de impurezas	≤ 10,00 % especies distintas de cadenas pesadas y ligeras	0,38	0,38	0,39	0,41	0,33			
CE-SDS no reductor									
% de impurezas	≤ 10,00 % especies distintas de la cadena principal	0,59	0,57	0,71	0,58	0,98			

FIG.2A

Datos de estabilidad para h409A11 Anti-PD-1 Polvo para inyección, 50 mg/vial									
Condición de almacenamiento									
25H (25 °C, 60 % HR)									
Número de lote									
1									
Intervalo de ensayo de estabilidad									
Ensayo	Aceptación de criterios clínicos	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses	12 meses			
HP-LEX									
Variantes ácidas (%)	Resultados informados	2,5	2,8	3,1	3,2	3,4			
Ácido 1 (%)	Resultados informados	3,7	3,5	3,7	4,0	4,0			
Ácido 2 (%)	Resultados informados	8,2	8,6	8,3	8,4	9,1			
Principal (%)	Resultados informados	50,8	53,4	48,6	46,7	46,6			
Básico 1 (%)	Resultados informados	11,0	10,8	10,8	11,3	10,4			
Básico 2 (%)	Resultados informados	8,9	8,4	9,0	8,9	9,1			
Variantes básicas (%)	Resultados informados	14,9	12,6	16,5	17,5	17,4			
Humedad (%)	≤ 5,0 %	0,3	0,5	0,6	0,8	0,9			
Materia particulada (HIAC*)	Cumple USP <788>								
≥ 10 µm por recipiente	NMT 6000	51	31	37	31	59			
≥ 25 µm por recipiente	NMT 600	2	1	1	1	0			
Endotoxina bacteriana	≤ 0,25 EU/mg	NT	NT	NT	NT	NT			
Esterilidad	Cumple los requisitos del ensayo de esterilidad	NT	NT	NT	NT	NT			
Integridad del cierre del envase	No se detecta fuga	NT	NT	NT	NT	NT			
Límite de cuantificación (QL) = 0,25 %, Límite de Detección (DL) = 0,10 %, NT = no ensayado, ND = no detectado									
# no ensayado de acuerdo con la solución de referencia "Y"									
* Se usó una versión modificada de USP<788> para el lote 1 pre-clínico									

FIG.2B

Datos de estabilidad para h409A11 Anti-PD-1 Polvo para inyección, 50 mg/vial									
RH4 (40 °C, 75 % HR)									
1									
Intervalo de ensayo de estabilidad									
Ensayo	Aceptación de criterios clínicos	Inicial	0,5 meses	1 mes	2 meses	3 meses	6 meses		
Condición de almacenamiento									
Número de lote									
Descripción Polvo liofilizado	Polvo blanco a blanquecino	Torta blanca	Torta blanca	Torta blanca	Torta blanca	Torta blanca	Torta blanca		
Tiempo de reconstitución (segundos)	Resultados indicados	39	31	33	37	33	39		
Descripción Solución reconstituida									
Claridad	Solución transparente a opalescente: puede contener particulados	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente		
Color	Resultados indicados por la solución de referencia "Y"	Incoloro#	Incoloro#	Incoloro#	Incoloro#	Incoloro#	Incoloro#		
pH	5,0 – 6,0	5,6	5,5	5,6	5,6	5,5	5,6		
Ensayo UV A₂₈₀ nm	21,3 – 28,8 mg/ml	24,9	25,5	24,2	24,1	23,9	24,3		
Potencia biológica ELISA competitivo anti-PD-1 (% relativo al control)	50-150 % de la referencia	95	85	83	77	86	97		
Pureza									
HP SEC									
Especie de alto peso molecular (%)	≤ 5,00	ND	ND	<DL	<QL	0,27	0,30		
Picos de elución tardía (%)	Resultados informados	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
Monómero (%)	≥ 90,0	100,0	100,0	99,9	99,8	99,7	99,7		
CE-SDS reductor									
% de impurezas	≤ 10,00 % especies distintas de cadenas pesadas y ligeras	0,38	0,38	0,33	0,39	0,42	0,40		
CE-SDS no reductor									
% de impurezas	≤ 10,00 % especies distintas de la cadena principal	0,59	0,58	0,56	0,50	0,60	0,72		

FIG.3A

Datos de estabilidad para h409A11 Anti-PD-1 Polvo para inyección, 50 mg/vial									
Condición de almacenamiento									
RH4 (40 °C, 75 % HR)									
Número de lote									
1									
Intervalo de ensayo de estabilidad									
Ensayo	Aceptación de criterios clínicos	Inicial	0,5 meses	1 mes	2 meses	3 meses	6 meses		
HP-IEX									
Variantes ácidas (%)	Resultados informados	2,5	2,7	2,4	2,5	3,0	3,3		
Ácido 1 (%)	Resultados informados	3,7	3,6	4,0	3,9	3,8	4,0		
Ácido 2 (%)	Resultados informados	8,2	8,7	9,2	9,4	9,5	10,0		
Principal (%)	Resultados informados	50,8	50,2	52,3	50,4	46,0	43,4		
Básico 1 (%)	Resultados informados	11,0	11,0	10,8	10,8	10,7	11,8		
Básico 2 (%)	Resultados informados	8,9	8,8	8,4	8,7	8,7	8,8		
Variantes básicas (%)	Resultados informados	14,9	15,0	12,9	14,4	18,2	18,7		
Humedad (%)	≤ 5,0 %	0,3	0,6	0,6	0,7	0,9	1,1		
Materia particulada (HIAC*)	Cumple USP <788>								
≥ 10 µm por recipiente	NMT 6000	51	40	37	65	28	43		
≥ 25 µm por recipiente	NMT 600	2	3	2	2	1	1		
Endotoxina bacteriana	≤ 0,25 EU/mg	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
Esterilidad	Cumple los requisitos del ensayo de esterilidad	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
Integridad del cierre del envase	No se detecta fuga	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
Límite de cuantificación (QL) = 0,25 %, Límite de Detección (DL) = 0,10 %, NT = no ensayado, ND = no detectado									
# no ensayado de acuerdo con la solución de referencia "Y"									
* Se usó una versión modificada de USP<788> para el lote 1 pre-clínico									

FIG.3B

Datos de estabilidad para h409A11 Anti-PD-1 Polvo para inyección, 50 mg/vial											
5 °C											
2											
Intervalo de ensayo de estabilidad											
Ensayo	Aceptación de criterios clínicos	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses		
Descripción Polvo liofilizado	Polvo blanco a blanquecino	Torta blanca	Torta blanca	Torta blanca	Torta blanca	Torta blanca	Torta blanca	Torta blanca	Torta blanca		
Tiempo de reconstitución (segundos)	Resultados indicados	49	30	36	27	22	23	27	36		
Descripción Solución reconstituida											
Claridad	Solución transparente a opalescente; puede contener particulados	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente		
Color	Resultados indicados por la solución de referencia "Y"	Incoloro#	Incoloro#	Incoloro#	Incoloro#	Incoloro#	Incoloro#	Incoloro#	Incoloro#		
pH	5,0 – 6,0	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,5		
Ensayo UV A₂₈₀ nm	21,3 – 28,8 mg/ml	25,6	26,4	25,2	26,1	23,2	24,6	24,7	25,5		
Potencia biológica ELISA competitivo anti-PD-1 (% relativo al control)	50-150 % de la referencia	108	88	86	94	86	82	90	103		
Pureza											
HP SEC											
Especie de alto peso molecular (%)	≤ 5,00	0,52	030	0,31	0,31	0,31	<DL	<QL	0,40		
Picos de elución tardía (%)	Resultados informados	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
Monómero (%)	≥ 90,0	99,5	99,7	99,7	99,7	99,7	99,9	99,8	99,6		
CE-SDS reductor											
% de impurezas	≤ 10,00 % especies distintas de cadenas pesadas y ligeras	0,37	0,36	0,38	0,37	0,38	0,39	0,45	0,64		

FIG.4A

Datos de estabilidad para h409A11 Anti-PD-1 Polvo para inyección, 50 mg/vial											
5 °C											
2											
Intervalo de ensayo de estabilidad											
Ensayo	Aceptación de criterios clínicos	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses		
CE-SDS no reductor											
% de impureza	≤ 10,00 % especies distintas de la banda principal	0,42	0,38	0,77	0,90	0,94	0,73	1,25	1,39		
HP-JEX											
Variantes ácidas (%)	Resultados informados	3,1	3,4	3,3	3,4	3,4	3,2	3,3	4,2		
Ácido 1 (%)	Resultados informados	4,0	3,9	4,0	4,0	4,0	3,8	3,8	3,9		
Ácido 2 (%)	Resultados informados	8,0	8,1	8,0	8,4	8,3	7,8	8,0	8,1		
Principal (%)	Resultados informados	47,4	47,8	47,4	47,9	47,3	45,8	47,6	46,1		
Básico 1 (%)	Resultados informados	11,4	11,4	11,6	10,5	12,3	11,6	10,9	11,2		
Básico 2 (%)	Resultados informados	8,8	8,9	9,2	8,9	9,4	9,6	8,5	8,7		
Variantes básicas (%)	Resultados informados	17,3	16,5	16,4	16,8	15,4	18,2	17,8	17,9		
Humedad (%)	≤ 5,0 %	0,8	0,8	0,8	1,1	1,3	1,1	1,1	1,3		
Materia particulada (HIAC*)	Cumple USP<788>										
≥ 10 µm por recipiente	NMT 6000	55	6	35	17	23	1	46	20		
≥ 25 µm por recipiente	NMT 600	0	0	1	1	1	0	0	2		
Endotoxina bacteriana	≤ 0,25 EU/mg	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
Esterilidad	Cumple los requisitos del ensayo de esterilidad	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
Integridad del cierre del envase	No se detecta fuga	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		

Límite de cuantificación (QL) = 0,25 %. Límite de Detección (DL) = 0,10 %, NT = no ensayado, ND = no detectado

no ensayado de acuerdo con la solución de referencia "Y"

* Se usó una versión modificada de USP<788> para el lote 2 pre-clínico

FIG.4B

Datos de estabilidad para h409A11 Anti-PD-1 Polvo para inyección, 50 mg/vial						
Condición de almacenamiento						
25H (25 °C, 60 % HR)						
B						
Número de lote		Intervalo de ensayo de estabilidad				
Ensayo	Descripción	Intervalo de ensayo de estabilidad	1 mes	3 meses	6 meses	
	Polvo liofilizado	Polvo blanco a blanquecino	Polvo blanco	Polvo blanco	Polvo blanco	
Tiempo de reconstitución (segundos)	Resultados indicados		49	33	31	23
Descripción Solución reconstituída						
Claridad	Solución transparente a opalescente: puede contener particulados	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente	
Color	Resultados indicados por la solución de referencia "Y"	Incoloro#	Incoloro#	Incoloro#	Incoloro#	
pH	5,0 – 6,0	5,6	5,6	5,6	5,6	
Ensayo UV A₂₈₀ nm	21,3 – 28,8 mg/ml	25,6	25,8	24,8	26,4	
Potencia biológica ELISA competitivo anti-PD-1 (% relativo al control)	50-150 % de la referencia	108	76	78	89	
Pureza						
HP SEC						
Especie de alto peso molecular (%)	≤ 5,00	0,52	0,30	0,34	0,33	
Picos de elución tardía (%)	Resultados informados	ND	ND	ND	ND	
Monómero (%)	≥ 90,0	99,5	99,7	99,7	99,7	
CE-SDS reductor						
% de impurezas	≤ 10,00 % especies distintas de cadenas pesadas y ligeras	0,37	0,31	0,39	0,27	
CE-SDS no reductor						
% de impurezas	≤ 10,00 % especies distintas de cadenas pesadas y ligeras	0,42	0,44	1,10	0,96	

FIG.5A

Datos de estabilidad para h409A11 Anti-PD-1 Polvo para inyección, 50 mg/vial						
Condición de almacenamiento						
25H (25 °C, 60 % HR)						
Número de lote						
B						
Intervalo de ensayo de estabilidad						
Ensayo	Aceptación de criterios clínicos	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses	
HP-IEX						
Variantes ácidas (%)	Resultados informados	3,1	3,3	3,3	3,4	
Ácido 1 (%)	Resultados informados	4,0	4,0	4,0	4,0	
Ácido 2 (%)	Resultados informados	8,0	8,2	8,4	8,9	
Principal (%)	Resultados informados	47,4	47,5	47,1	47,2	
Básico 1 (%)	Resultados informados	11,4	11,4	11,5	10,5	
Básico 2 (%)	Resultados informados	8,8	9,0	9,1	8,8	
Variantes básicas (%)	Resultados informados	17,3	16,6	16,5	17,2	
Humedad (%)	≤ 5,0 %	0,8	0,9	1,1	1,2	
Materia particulada (HIAC*)	Cumple USP <788>					
≥ 10 µm por recipiente	NMT 6000	55	11	34	6	
≥ 25 µm por recipiente	NMT 600	0	0	1	0	
Endotoxina bacteriana	≤ 0,25 EU/mg	NT	NT	NT	NT	
Esterilidad	Cumple los requisitos del ensayo de esterilidad	NT	NT	NT	NT	
Integridad del cierre del envase	No se detecta fuga	NT	NT	NT	NT	
Límite de cuantificación (QL) = 0,25 %, Límite de Detección (DL) = 0,10 %, NT = no ensayado, ND = no detectado						
# no ensayado de acuerdo con la solución de referencia "Y"						
* Se usó una versión modificada de USP<788> para el lote 2 pre-clínico						

FIG.5B

Datos de estabilidad para h409A11 Anti-PD-1 Polvo para inyección, 50 mg/vial						
Condición de almacenamiento		RH4 (40 °C, 75 % HR)				
Número de lote		2				
Ensayo	Aceptación de criterios clínicos	Inicial	Intervalo de ensayo de estabilidad			
			1 mes	3 meses	6 meses	
Descripción	Polvo blanco a blanquecino	Polvo blanco	Polvo blanco	Polvo blanco	Polvo blanco	Polvo blanco
Tiempo de reconstitución (segundos)	Resultados indicados	49	32	35	20	
Descripción						
Solución reconstituida	Solución transparente a opalescente: puede contener particulados	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente	Solución opalescente
Claridad	Resultados indicados por la solución de referencia "Y"	Incoloro*	Incoloro*	Incoloro*	Incoloro*	Incoloro*
Color						
pH	5,0 – 6,0	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6
Ensayo UV A ₂₈₀ nm	21,3 – 28,8 mg/ml	25,6	24,9	24,9	25,9	
Potencia biológica						
ELISA competitivo anti-PD-1 (% relativo al control)	50-150 % de la referencia	108	76	60	66	
Pureza						
HPSEC						
Especie de alto peso molecular (%)	≤ 5,00	0,52	0,34	0,37	0,38	
Picos de elución tardía (%)	Resultados informados	ND	ND	ND	ND	
Monómero (%)	≥ 90,0	99,5	99,7	99,6	99,6	
CE-SDS reductor						
% de impurezas	≤ 10,00 % especies distintas de cadenas pesadas y ligeras	0,37	0,39	0,45	0,34	
CE-SDS no reductor						
% de impurezas	≤ 10,00 % especies distintas de la cadena principal	0,42	0,43	1,16	0,97	

FIG. 6A

Datos de estabilidad para h409A11 Anti-PD-1 Polvo para inyección, 50 mg/vial							
Condición de almacenamiento							
RH4 (40 °C, 75 % HR)							
Número de lote							
3							
Ensayo	Aceptación de criterios clínicos	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses		
HP-LEX							
Variantes ácidas (%)	Resultados informados	3,1	3,4	3,3	3,5		
Ácido 1 (%)	Resultados informados	4,0	4,0	4,3	4,1		
Ácido 2 (%)	Resultados informados	8,0	8,8	9,4	10,2		
Principal (%)	Resultados informados	47,4	46,8	45,9	44,8		
Básico 1 (%)	Resultados informados	11,4	11,7	11,4	10,4		
Básico 2 (%)	Resultados informados	8,8	9,1	8,9	8,9		
Variantes básicas (%)	Resultados informados	17,3	16,4	16,8	18,0		
Humedad (%)	≤ 5,0 %	0,8	1,1	1,3	1,7		
Materia particulada (HIAC*)	Cumple USP <788>						
≥ 10 µm por recipiente	NMT 6000	55	11	14	35		
≥ 25 µm por recipiente	NMT 600	0	0	0	0		
Endotoxina bacteriana	≤ 0,25 EU/mg	NT	NT	NT	NT		
Esterilidad	Cumple los requisitos del ensayo de esterilidad	NT	NT	NT	NT		
Integridad del cierre del envase	No se detecta fuga	NT	NT	NT	NT		

NT = no ensayado, ND = no detectado

no ensayado de acuerdo con la solución de referencia "Y"

* Se usó una versión modificada de USP<788> para el lote 2 pre-clínico

FIG.6B

Datos de estabilidad para h409A11 Anti-PD-1 Polvo para inyección, 50 mg/vial										
Condición de almacenamiento		5 °C								
Número de lote		3								
		Intervalo de ensayo de estabilidad								
Ensayo	Aceptación de criterios clínicos	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	
Descripción Polvo liofilizado	Polvo blanco a blanquecino	Polvo blanco	Polvo blanco	Polvo blanco	Polvo blanco	Polvo blanco	Polvo blanco	Polvo blanquecino	Polvo blanco	
Tiempo de reconstitución (segundos)	Resultados indicados	41	35	34	32	32	38	42	32	
Descripción Solución reconstituida										
Claridad	Solución transparente a opalescente; puede contener particulados	Solución opalescente no contiene particulados	Solución opalescente no contiene particulados	Solución opalescente no contiene particulados	Solución opalescente no contiene particulados	Solución opalescente no contiene particulados	Solución opalescente no contiene particulados	Solución opalescente no contiene particulados	Solución opalescente no contiene particulados	
Color	Resultados indicados por la solución de referencia "Y"	Equivalente a la solución de referencia Y7	Equivalente a la solución de referencia Y7	Equivalente a la solución de referencia Y7	Equivalente a la solución de referencia Y7	Equivalente a la solución de referencia Y7	Equivalente a la solución de referencia Y7	Equivalente a la solución de referencia Y7	Equivalente a la solución de referencia Y7	
pH	5,0 – 6,0	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	
Ensayo UV A₂₈₀ nm	21,3 – 28,8 mg/ml	25,6	25,3	25,5	25,5	25,5	26,3	26,6	25,7	
Potencia biológica	50-150 % de la referencia	90	102	96	102	106	105	71	98	
Pureza										
HP SEC										
Especie de alto peso molecular (%)	≤ 5,00	0,32	0,27	0,28	0,25	0,31	0,36	0,32	0,36	
Picos de elución tardía (%)	Resultados informados	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	
Monómero (%)	≥ 90,0	99,7	99,7	99,7	99,8	99,7	99,6	99,7	99,6	
CE-SDS reductor										
% de impurezas	≤ 10,00 % especies distintas de cadenas pesadas y ligeras	0,42	0,42	0,46	0,44	0,41	0,56	0,44	0,44	

FIG.7A

Datos de estabilidad para h409A11 Anti-PD-1 Polvo para inyección, 50 mg/vial											
Condición de almacenamiento		5 °C									
Número de lote		3									
Ensayo	Aceptación de criterios clínicos	Intervalo de ensayo de estabilidad									
		Inicial	1 mes	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses		
CE-SDS no reductor	Cadenas ligeras										
% de impureza	≤ 10,00 % especies distintas de la banda principal	0,45	0,47	0,42	0,55	0,78	0,31	0,60	0,55		
HP-LEX											
Variantes ácidas (%)	Resultados informados	3,97	8,45	8,06	6,79	8,52	9,29	8,71	9,70		
Ácido 1 (%)	Resultados informados	5,45	4,99	5,05	4,97	4,75	5,07	4,90	4,91		
Ácido 2 (%)	Resultados informados	7,76	8,26	8,26	8,02	7,91	8,48	8,48	8,59		
Principal (%)	Resultados informados	54,4	48,3	47,3	48,9	46,2	47,0	46,6	44,9		
Básico 1 (%)	Resultados informados	7,23	7,63	7,82	7,98	7,69	7,77	8,04	8,43		
Básico 2 (%)	Resultados informados	7,92	8,65	9,23	9,33	9,07	8,87	9,08	9,08		
Variantes básicas (%)	Resultados informados	13,22	13,75	14,29	14,03	15,82	13,51	14,20	14,38		
Humedad (%)	≤ 5,0 %	0,8	0,8	0,9	0,8	0,8	1,0	1,0	1,0		
Materia particulada (HIAC*)	Cumple USP <788>	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple		
≥ 10 µm por recipiente	NMT 6000	39	24	16	18	18	16	16	47		
≥ 25 µm por recipiente	NMT 600	0	1	0	1	0	0	0	2		
Endotoxina bacteriana	≤ 0,25 EU/mg	<0,05	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
Esterilidad	Cumple los requisitos del ensayo de esterilidad	Cumple los requisitos	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
No se detecta fuga	No se detecta fuga	No se detecta fuga	NT	NT	NT	NT	No se detecta fuga	NT	No se detecta fuga		
NT = no ensayado											

FIG.7B

Datos de estabilidad para h409A11 Anti-PD-1 Polvo para inyección, 50 mg/vial						
Condición de almacenamiento						
25H (25 °C, 60 % HR)						
Número de lote						
3						
Intervalo de ensayo de estabilidad						
Ensayo	Aceptación de criterios clínicos	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses	
Descripción Polvo liofilizado	Polvo blanco a blanquecino	Polvo blanco	Polvo blanco	Polvo blanco	Polvo blanco	
Tiempo de reconstitución (segundos)	Resultados indicados	41	35	33	35	
Descripción Solución reconstituida						
Ciudad	Solución transparente a opalescente: puede contener particulados	Solución opalescente no contiene particulados	Solución opalescente no contiene particulados	Solución opalescente no contiene particulados	Solución opalescente no contiene particulados	
Color	Resultados indicados por la solución de referencia "Y"	Equivalente a la solución de referencia Y7	Equivalente a la solución de referencia Y7	Equivalente a la solución de referencia Y7	Equivalente a la solución de referencia Y7	
pH	5,0 – 6,0	5,5	5,5	5,5	5,5	
Ensayo UV A₂₈₀ nm	21,3 – 28,8 mg/ml	25,6	25,4	25,8	25,9	
Potencia biológica ELISA competitivo anti-PD-1 (% relativo al control)	50-150 % de la referencia	90	107	89	99	
F						
HPSEC						
Especie de alto peso molecular (%)	≤ 5,00	0,32	0,28	0,25	0,32	
Picos de elución tardía (%)	Resultados informados	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	
Monómero (%)	≥ 90,0	99,7	99,7	99,7	99,7	
CE-SDS reductor						
% de impurezas	≤ 10,00 % especies distintas de cadenas pesadas y ligeras	0,42	0,42	0,43	0,45	
CE-SDS no reductor						
% de impurezas	≤ 10,00 % especies distintas de la cadena principal	0,45	0,71	0,43	0,53	

FIG.8A

Datos de estabilidad para h409A11 Anti-PD-1 Polvo para inyección, 50 mg/vial						
Condición de almacenamiento						
25H (25 °C, 60 % HR)						
Número de lote						
3						
Intervalo de ensayo de estabilidad						
Ensayo	Aceptación de criterios clínicos	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses	
HP-IEX						
Variantes ácidas (%)	Resultados informados	3,97	8,52	8,67	9,79	
Ácido 1 (%)	Resultados informados	5,45	4,97	5,09	5,04	
Ácido 2 (%)	Resultados informados	7,76	8,40	8,60	8,49	
Principal (%)	Resultados informados	54,4	48,0	45,9	44,9	
Básico 1 (%)	Resultados informados	7,23	7,65	7,89	8,09	
Básico 2 (%)	Resultados informados	7,92	8,60	9,22	9,37	
Variantes básicas (%)	Resultados informados	13,22	13,88	14,67	14,35	
Humedad (%)	≤ 5,0 %	0,8	0,9	1,0	1,2	
Materia particulada (HIAC*)	Cumple USP <788>	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	
≥ 10 µm por recipiente	NMT 6000	39	10	18	21	
≥ 25 µm por recipiente	NMT 600	0	0	0	0	
Endotoxina bacteriana	≤ 0,25 EU/mg	<0,05	NT	NT	NT	
Esterilidad	Cumple los requisitos del ensayo de esterilidad	Cumple los requisitos	NT	NT	NT	
Integridad del cierre del envase	No se detecta fuga	No se detecta fuga	NT	NT	NT	
NT = no ensayado						

FIG.8B

Datos de estabilidad para h409A11 Anti-PD-1 Polvo para inyección, 50 mg/vial						
Condición de almacenamiento						
RH4 (40 °C, 75 % HR)						
Número de lote						
3						
Intervalo de ensayo de estabilidad						
Ensayo	Aceptación de criterios clínicos	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses	
Descripción Polvo liofilizado	Polvo blanco a blanquecino	Polvo blanco	Polvo blanco	Polvo blanco	Polvo blanco	
Tiempo de reconstitución (segundos)	Resultados indicados	41	35	34	33	
Descripción Solución reconstituida						
Claridad	Solución transparente a opalescente: puede contener particulados	Solución opalescente no contiene particulados	Solución opalescente no contiene particulados	Solución opalescente no contiene particulados	Solución opalescente no contiene particulados	
Color	Resultados indicados por la solución de referencia "Y"	Equivalente a la solución de referencia Y7	Equivalente a la solución de referencia Y7	Equivalente a la solución de referencia Y7	Equivalente a la solución de referencia Y7	
pH	5,0 – 6,0	5,5	5,5	5,5	5,5	
Ensayo UV A₂₈₀ nm	21,3 – 28,8 mg/ml	25,6	25,4	25,5	25,9	
Potencia biológica	50-150 % de la referencia	90	101	105	104	
Pureza						
HPSEC						
Especie de alto peso molecular (%)	≤ 5,00	0,32	0,30	0,33	0,40	
Picos de elución tardía (%)	Resultados informados	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	
Monómero (%)	≥ 90,0	99,7	99,7	99,7	99,6	
CE-SDS reductor						
% de impurezas	≤ 10,00 % especies distintas de cadenas pesadas y ligeras	0,42	0,50	0,48	0,45	
CE-SDS no reductor						
% de impurezas	≤ 10,00 % especies distintas de la cadena principal	0,45	0,52	0,67	0,35	

FIG.9A

Datos de estabilidad para h409A11 Anti-PD-1 Polvo para inyección, 50 mg/vial						
Condición de almacenamiento						
RH4 (40 °C, 75 % HR)						
Número de lote						
3						
Ensayo	Aceptación de criterios clínicos	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses	
HP-LEX						
Variantes ácidas (%)	Resultados informados	3,97	8,16	9,32	9,47	
Ácido 1 (%)	Resultados informados	5,45	5,11	5,12	5,08	
Ácido 2 (%)	Resultados informados	7,76	8,88	9,47	10,11	
Principal (%)	Resultados informados	54,4	47,1	43,4	42,2	
Básico 1 (%)	Resultados informados	7,23	7,75	8,22	8,41	
Básico 2 (%)	Resultados informados	7,92	8,51	9,11	9,12	
Variantes básicas (%)	Resultados informados	13,22	14,48	15,32	15,66	
Humedad (%)	≤ 5,0 %	0,8	1,1	1,3	1,5	
Materia particulada (HIAC*)	Cumple USP <788>	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	
≥ 10 µm por recipiente	NMT 6000	39	14	19	26	
≥ 25 µm por recipiente	NMT 600	0	0	0	1	
Endotoxina bacteriana	≤ 0,25 EU/mg	<0,05	NT	NT	NT	
Esterilidad	Cumple los requisitos del ensayo de esterilidad	Cumple los requisitos	NT	NT	NT	
Integridad del cierre del envase	No se detecta fuga	No se detecta fuga	NT	NT	NT	
NT = no ensayado						

FIG.9B